

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



Autor: MUDr. Martina Mindlová

Název: BK-polyomavirová infekce u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu

Title: BK-polyomavirus infection in patients after simultaneous pancreas and kidney transplantation

Typ závěrečné práce: **Dizertační**

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne.....

MUDr. Martina Mindlová

Podpis

Identifikační záznam:

MINDLOVÁ, Martina. *BK-polyomavirová infekce u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu [BK-polyomavirus infection in patients after simultaneous pancreas and kidney transplantation]*. Praha, 2011. 153 s., 5 příl., Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika Diabetologie IKEM. Školitel Saudek, František.

Abstrakt

Úvod. Cílem práce bylo zavedení vyšetřovací metody BK virémie, verifikace její přesnosti, zjištění prevalence a rizikových faktorů BKV replikace a analýza průběhu a terapeutických přístupů BKV infekce a BKVN u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) za účelem zavedení systematického skríningu.

Metody. Výsledky BK virémie stanovené nově zavedenou metodou Affigene® PCR v IKEM a dle PCR protokolu Virologického centra, Basilej byly porovnány. Poté bylo vyšetřeno 183 SPK příjemců ke stanovení prevalence BK virémie, virurie a BKVN a zhodnoceny rizikové faktory replikace BKV. Retrospektivně proběhlo hodnocení výsledků retransplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN.

Výsledky. Ze 100 vzorků analyzovaných dle Affigene® BKV trender a Transplantační virologie, Basilej PCR protokolů byla shoda obou metod 95%, $Rho = 0,946$, 95% CI: 0.920 – 0.963, $P < 0,0001$, Bland–Altman plot analýza: bias Basilej PCR protokol/Affigene® BKV trender: -0,1 (průměr) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3] pro obě metody. Point prevalence byla analyzována u 183 pacientů; Virurie detekována u 17,3 %, virémie u 3.8% pacientů. Pozitivní virurie $>10^7$ kopií/mL zjištěna u 3,7% pacientů, pozitivní virémie $>10^4$ u 1,6% pacientů současně s pozitivní virurií. BKVN zjištěna u 0,5% pacientů. Trvání diabetu před SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p = 0.028$) a opožděný nástup funkce štěpu ledviny (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p = 0.0085$) jsou nezávislé rizikové faktory BKV replikace.

Shrnutí. Affigene® PCR protokol zavedený v IKEM ke stanovení BK virémie je kvalitní metoda srovnatelná s výsledky PCR metody Virologického centra, Basilej. Prevalence pozitivní BK virémie, virurie i BKVN u SPK příjemců v našem centru je velmi nízká. Trvání diabetu před SPK a opožděný nástup funkce štěpu ledviny jsou nezávislé rizikové faktory BKV replikace. Retransplantace ledviny po selhání na podkladě BKVN je metodou volby.

Klíčová slova. Polyomavirus BK, Kombinovaná transplantace ledviny a pankreatu, kvantitativní real-time PCR, prevalence, rizikové faktory, retransplantace

Abstract

Introduction. The aim of the study was to introduce a new BKV PCR protocol in our centre and to verify its accuracy as well as to assess the prevalence, risk factors of BK virus replication, course of BKV infection and therapeutic approaches in simultaneous pancreas and kidney (SPK) recipients in order to design a screening protocol.

Methods. The results analysed by both Affigene® and Transplantation Virology, Basel PCR protocols were compared. Thereafter 183 SPK patients were examined to assess the prevalence of BK viremia, viruria and BKVN and to identify the risk factors of BKV replication. The cases of retransplantation after a graft loss due to BKVN were retrospectively described.

Results. 100 of results were analysed according to the Affigene® and Transplantation Virology, Basel PCR protocols with the accordance of 95%, $Rho = 0,946$, 95% CI: 0.920 – 0.963, $P < 0,0001$, Bland–Altman plot analyses: bias Basel PCR protocol/Affigene® BKV trender: -0,1 (mean) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3] for both methods. Point-prevalence was assessed in 183 patients; Viruria found in 17,3 %, viremia in 3.8% of patients. High-level viruria $>10^7$ copies/mL detected in 3,7% of patients, high-level viremia $>10^4$ in 1,6% of patients simultaneously with high-level viruria. BKVN was found in 0,5% of patients. Diabetes duration before SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p = 0.028$) and delayed graft function (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p = 0.0085$) were independent risk factors of BKV replication.

Conclusion. The Affigene® PCR protocol newly introduced in our centre is a high-quality and fully comparable method with the Transplantation Virology, Basel PCR protocol. Prevalence of high-level BK viremia, viruria and BKVN were low in our centre. Diabetes duration before SPK and delayed graft function were independent risk factors of BKV replication. Kidney retransplantation after a graft loss due to BKVN is a relevant therapeutic option.

Key words. Polyomavirus BK, simultaneous pancreas and kidney transplantation, quantitative real-time PCR, prevalence, risk factors, retransplantation

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
OBSAH	5
1 PODĚKOVÁNÍ.....	8
2 ÚVOD.....	9
2.1 TAXONOMIE A ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY POLYOMAVIRŮ.....	9
2.2 EPIDEMIOLOGIE BK VIRU V OBECNÉ POPULACI.....	9
2.3 BKV INFEKCE A BKV NEMOC U IMUNOSUPRIMOVANÝCH PACIENTŮ	10
2.4 STRUKTURA BK VIRU	10
2.4.1 <i>Struktura genomu BK viru</i>	10
2.4.2 <i>Struktura virové kapsidy a vazebného místa na povrchu virionu</i>	12
2.5 PRŮNIK POLYOMAVIRŮ DO BUŇKY A JEJICH INTERAKCE S NITROBUNĚČNÝMI PROCESY	13
2.5.1 <i>Polyomavirové receptory na povrchu hostitelských buněk a vstup viru do buňky</i>	13
2.5.2 <i>Nitrobuněčný transport polyomavirů</i>	17
..2.5.2.1 Transport virionu z povrchu buňky do endoplazmatického retikula	17
2.5.2.2 Děje probíhající v endoplazmatickém retikulu a vstup virové DNA do jádra.....	18
2.5.3 <i>Latence a interakce polyomavirové DNA s jadernými doménami</i>	20
2.5.3.1 Episomální latence polyomavirové DNA.....	20
2.5.3.2 Interakce polyomavirové DNA s jadernými doménami	20
2.5.4 <i>Replikace polyomavirové DNA a transkripce virových proteinů</i>	21
2.5.5 <i>„Assembly“, maturace a uvolnění nových virionů</i>	22
2.6 BK-VIRUS SPECIFICKÁ IMUNITA.....	23
2.7 BKVN PO TRANSPLANTACI LEDVINY.....	24
2.7.1 <i>Rizikové faktory BKVN</i>	24
2.7.2 <i>Diagnostické metody BKVN</i>	25
2.7.2.1 Exfoliativní cytologie moči	25
2.7.2.2 Kvantitativní real-time PCR.....	25
2.7.2.2.1 Extrakce DNA ze vzorku	26
2.7.2.2.2 PCR reakce	27
2.7.2.2.3 Kvantifikace počtu kopií DNA.....	28
2.7.2.2.4 Ovlivnění výsledku volbou specifického PCR protokolu.....	31
2.7.2.3 Biopsie štěpu ledviny	32
2.7.2.4 Méně rozšířené a experimentální diagnostické metody replikace BK-viru	33
2.7.3 <i>Terapie BKVN</i>	34
2.7.3.1 Úprava imunosupresivní terapie	34
2.7.3.2 Antivirotika a látky s antipolyomavirovou aktivitou	35
2.7.3.2.1 Cidofovir	35
2.7.3.2.2 Leflunomid	37
2.7.3.2.3 Fluorochinolony	38
2.7.3.2.4 Intravenózní imunoglobuliny (IVIg).....	39
2.7.3.3 Porovnání účinnosti terapeutických přístupů.....	39
2.7.4 <i>Skrining replikační aktivity BK-viru jako diagnostická metoda „presumptive BKVN“</i>	40
2.7.5 <i>Re-transplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN</i>	42
2.8 BKVN PO TRANSPLANTACI LEDVINY A PANKREATU	42
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	44

4	STUDIE 1	45
4.1	ÚVOD A HYPOTÉZA.....	45
4.2	METODIKA	45
4.2.1	<i>Vyšetření BK-virémie v IKEM (affigene® BKV trender PCR protokol)</i>	<i>46</i>
4.2.1.1	Extrakce DNA ze vzorku	46
4.2.1.1.1	Krok I: příprava reagensí.....	46
4.2.1.1.2	Krok II: Lyze bezbuněčných vzorků	46
4.2.1.1.3	Krok III: Vazba na kolonku a vymytí DNA	47
4.2.1.1.4	Krok IV: Eluce DNA do 60 µl	47
4.2.1.2	Provedení kvantitativní real-time PCR.....	48
4.2.1.2.1	Krok I: Příprava pracovní matice	48
4.2.1.2.2	Krok II: Příprava zkumavek k PCR reakci	49
4.2.1.2.3	Krok III: Amplifikace a kvantifikace DNA	49
4.2.2	<i>PCR protokol laboratoře Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej</i>	<i>51</i>
4.3	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	51
4.4	VÝSLEDKY.....	51
4.5	DISKUSE.....	57
4.6	SHRNUTÍ.....	57
5	STUDIE 2	59
5.1	ÚVOD A HYPOTÉZA.....	59
5.2	METODIKA	60
5.2.1	<i>Provedení studie</i>	<i>60</i>
5.2.2	<i>Imunosupresivní terapie</i>	<i>60</i>
5.3	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	61
5.4	VÝSLEDKY.....	61
5.5	DISKUSE.....	66
5.6	SHRNUTÍ.....	70
6	STUDIE 3	71
6.1	ÚVOD A HYPOTÉZA.....	71
6.2	METODIKA	72
6.3	VÝSLEDKY.....	72
6.4	DISKUSE.....	75
6.5	SHRNUTÍ.....	76
7	ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ.....	77
8	POUŽITÁ LITERATURA	78
9	VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA.....	89
9.1	PUBLIKACE TÝKAJÍCÍ SE TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	89
9.1.1	<i>Články</i>	<i>89</i>
9.1.2	<i>Přednášky a postery na kongresech a sympóziích.....</i>	<i>89</i>
9.2	PUBLIKACE, KTERÉ PŘÍMO NESOUVISEJÍ S TÉMATEM DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	91
9.2.1	<i>Články</i>	<i>91</i>
9.2.2	<i>Přednášky a postery na kongresech a sympóziích</i>	<i>91</i>
10.	PŘÍLOHA 1. MINDLOVÁ M, SAUDEK F. Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykémiami, jeho klinické hodnocení a terapie. Prakt. Lék. 2007, 87, No. 1, pp. 52-57.....	93

11.	PŘÍLOHA 2. Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, Mindlová M , Girman P, Dovolilová E, Karasová L, Saudek F. Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. Folia Biol (Praha). 2007;53(1):13-22. IF2007:1,140	102
12.	PŘÍLOHA 3. Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. Kidney retransplantation following graft loss to polyoma virus-associated nephropathy: an effective treatment option in simultaneous pancreas and kidney transplant recipients. Transpl Int. 2008 Apr;21(4):353-6. IF 2008: 3,115	117
13.	PŘÍLOHA 4. SAUDEK F., GIRMAN P., KŘÍŽ J., BERKOVÁ Z., ZACHAROVOVÁ K., KOBLAS T., PEKTOROVÁ L., VÁVROVÁ E., MINDLOVÁ M. , HABART D., PEREGRIN J., LIPÁR K., OLIVERIUS M., DOVOLILOVÁ E., ČÍHALOVÁ E., BOBEK V. LÉČBA DIABETU TRANSPLANTACÍ IZOLOVANÝCH LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ. ČAS. LÉK. ČES., 2011, 150, PP. 49-55.....	124
14.	PŘÍLOHA 5. Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center. Clin Transplant. Přijato k publikaci 5.4.2011 IF 2009: 2,004	135

1 Poděkování

Prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc. – za odborné vedení a školení v experimentální vědecké práci, za laskavé předávání vědomostí a formování exaktního vědeckého přístupu

MUDr. Petru Boučkovi – za možnost podílet se na řešení jím navrženého výzkumného úkolu a dále za poskytnutí praktických vědomostí a dovedností nezbytných v každodenní výzkumné práci

Prof. Hans H. Hirschovi – za velmi fundované odborné připomínky a konzultace ohledně interpretace získaných výsledků a jejich prezentace v impaktovaných publikacích, dále za provedení kvantitativní real-time PCR analýzy vzorků našich pacientů a za možnost využít jeho laboratoře jako referenčního centra.

RNDr. Marcele Jarešové – za neocenitelnou pomoc a podporu při pronikání do tajů laboratorní práce a kvantitativní real-time PCR metody

Bc. Teodoře Jedinákové – za pomoc při sběru vzorků a jejich přípravě k analýze

Mgr. Jeleně Skibové – za statistickou analýzu výsledků

MUDr. Ludku Voskovi – za histologickou diagnostiku BKVN a za laskavé poskytnutí fotografií bioptických nálezů našich pacientů

2 Úvod

Výzkum polyomavirových infekcí jde ruku v ruce s transplantačním programem, kdy vzhledem k imunosupresivní terapii výrazně narůstá výskyt oportunních infekcí obecně. Z virových infekcí patří největší pozornost problematice CMV nemoci, která tíží i frekvencí výskytu patří k nejzávažnějším, nicméně ani polyomavirové infekce nejsou u imunosuprimovaných jedinců zanedbatelné.

BK-polyomavirová nemoc se nejčastěji projevuje jako intersticiální nefritis štěpu ledviny, proto drtivá většina doposud zveřejněných prací publikovala data o pacientech po transplantaci samotné ledviny. Vzhledem ke specifické problematice a relativně nízkému počtu pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu v jednotlivých centrech bylo o BKV infekci u této populace pacientů doposud publikováno velmi omezené množství informací.

Rozhodli jsme se proto zavést diagnostickou metodu BKV infekce v našem centru a následně provést prospektivní studii věnovanou frekvenci výskytu BKV infekce, rizikovým faktorům, terapii BKV nemoci, problematice re-transplantace štěpu po selhání na podkladě BK virové nefropatie a v neposlední řadě navržení skriningového programu BK virémie u pacientů po transplantaci ledviny a pankreatu.

2.1 Taxonomie a základní charakteristiky polyomavirů

Polyomaviry patří mezi papovaviridae společně s lidským papillomavirem. Dle Baltimorské klasifikace je řadíme do skupiny I (viry s ds-DNA genomem). Rod polyomaviridae zahrnuje v současnosti 14 druhů, jejichž hostiteli jsou převážně savci. K zástupcům rodu polyomavirus patří jednak druhy, které způsobují onemocnění u člověka: tj. polyomavirus BK (BK virus), JC virus, dále Simian virus (SV40) způsobující onemocnění u opic (makakové) podobně jako JCV nebo BKV u člověka a další nově objevené (např. polyomaviry KI, WU a MCV-(Merkel cell polyomavirus)), které byly rovněž izolovány z lidských tkání (1). Zástupci rodiny polyomavirů vykazují přísnou druhovou i tkáňovou specifitu pokud jde o produktivní (lytickou) formu infekce, ale mohou indukovat maligní transformaci buněk i u druhů a tkání, které nejsou permissivní pro jejich replikaci.

2.2 Epidemiologie BK viru v obecné populaci

BK virus je v prostředí běžně rozšířen, séropozitivitu v IgG třídě vykazuje více než 80% dospělé populace (1) (2) (3). Přenos se děje pravděpodobně již raněm v dětství (3.- 5.rok) cestou respiračního nebo zažívacího traktu. Mezi další možné způsoby přenosu BKV infekce patří cesta urino-orální, sexuální, krevními převody, transplacentárně a transplantací orgánů (1) (2). Primoinfekce bývá zcela bez příznaků nebo probíhá jako tzv. flu-like syndrom. Virus poté persistuje převážně v tubulárním

epitelu ledvin, v urotelu a v prostatické tkáni. BKV DNA však byla izolována i z periferních mononukleárů, ze sleziny či z mozku. Není ještě zcela objasněno, zda virus po vstupu do buňky v ní pouze latentně persistuje nebo zda probíhá jistá minimální míra replikace. Pozorování svědčí spíše pro intermitentní replikaci i u imunokompetentních jedinců, neboť u 3% zdravých těhotných žen ve 2. a 3. trimestru gravidity (1) a u 7% zdravých jedinců (dárců krve) (3) byla zjištěna BK-virurie.

2.3 BKV infekce a BKV nemoc u imunosuprimovaných pacientů

U pacientů s vrozenou nebo získanou poruchou funkce nebo počtu CD4 a/nebo CD8 pozitivních T-lymfocytů dochází k nárůstu replikace BK viru (BKV infekce) a k orgánovému poškození (BKV nemoc). Mezi nejčastější projevy BKV nemoci patří BK-virová intersticiální nefritis transplantované ledviny (BKVN) s klinickým obrazem asymptomatického zhoršení funkce štěpu (2). K dalším projevům BKV nemoci patří stenóza ureteru nebo striktura uretry u příjemců štěpu ledviny (1) (2) (4), dále pak hemoragická cystitis u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (2) (5) a u HIV pozitivních (2). Vzácně byly popsány jednotlivé případy systémové BKV infekce u HIV pozitivních pacientů či u dětských pacientů s vrozenými poruchami imunity nebo selhání vlastních ledvin u příjemců jiných orgánů (pankreas, srdce) (2).

BK virus byl poprvé popsán v roce 1971. Virus byl izolován z moči pacienta po transplantaci ledviny a byl pojmenován B.K. dle iniciál onoho pacienta (6). Až v 90. letech 20. století však začala být infekce BK virem spojována s bioptickým obrazem intersticiální nefritis transplantované ledviny a začala být brána v úvahu jako možná příčina selhání funkce štěpu (7) (8) (9).

2.4 Struktura BK viru

2.4.1 Struktura genomu BK viru

Virion BKV je neobalený, jeho kapsida má tvar dvacetistěnu (ikosaedr) s kubickým typem symetrie, který měří v průměru 45µm. Kapsida obsahuje dvouvláknovou cirkulární DNA o velikosti 5130 párů bazí (bp). Obě vlákna jsou nositeli dědičné informace. DNA má vysoce organizovanou strukturu, tzv. „supercoiled form“, podobnou plasmidové DNA, a je asociována se čtyřmi typy histonů (H2A, H2B, H3 a H4). Toto uspořádání zajišťuje, že maximum genetické informace (tj. 6 genů) zaujímá co nejméně místa (10). Genom BK viru vykazuje 75% homologii s JCV a 73% homologii s SV40 (2) (11). Znalost homologních sekvencí je důležitá v diagnostice, aby byla vyloučena zkřížená reaktivita s JCV či SV40.

Genom BKV lze na základě funkce jednotlivých genů a čase jejich exprese rozdělit na region regulační, časný a pozdní. V regulačním (nekódujícím) regionu se nachází promotor, enhancer a replikační

počátek. Regulační region obsahuje sekvence, které se slouží jako vazebná místa hormonů (tzv. hormone response units), konkrétně např. glukokortikoid a/nebo progesteron response element (GRE/PRE) a estrogen response element (ERE) (12).

Dále následují geny časně fáze, které kódují mimo jiné „Large Tumor antigen (LT-Ag)“, „small T-Ag“ a tzv. agnoprotein. Znalost sekvenční variability nukleotidů jednotlivých genů umožňuje na základě SNP (single nucleotid polymorphism) analýzy rozdělení BKV do jednotlivých subtypů (Ia, Ic, III, IV, V a VI). Prevalence jednotlivých genotypů v populaci se liší geograficky. Např. typ Ia je nejvíce rozšířen v Africe, Ic v severovýchodní Asii a Japonsku, III v Africe, IV a V v Evropě a v Asii a IV v jihovýchodní Asii (13). Typizace BKV se zpočátku prováděla sérologicky, nyní se však dává přednost genotypizaci prováděné na základě struktury genu VP1, genu Large T antigenu, popřípadě sekvenováním celého genomu. Sekvenování genomu BKV nám poskytuje jednak informace o evoluci BK viru (fylogenetický strom) a hlavně znalosti nutné při navrhování sond a primerů pro PCR diagnostiku (14).

T-antigen je nukleární fosfoprotein, který se váže se na replikační počátek, má DNA helikázovou aktivitu, aktivuje DNA-polymerázu hostitelské buňky a replikační protein A a interaguje s topoisomérázou I. T-antigen rovněž zasahuje do regulace buněčného cyklu interakcí s produkty tumor-supresorových genů (proteiny rodiny RB a p53, konkrétně p105, RB1, p107 a p130 RB2) a má tudíž významný onkogenní potenciál (11). Bylo prokázáno, že BKV T-antigen rovněž indukuje mutace genomu hostitelské buňky, tj. numerické a strukturální změny chromozomů. V in vitro studii na lidských embryonálních fibroblastech byly po infekci BKV pozorovány zlomy, delece, duplikace, translokace, „ring-chromozomy“ i dicentrické chromozomy. Změny chromozomů u těchto buněk transfekovaných geny časně fáze BKV (BKV early region) byly nejvíce patrné v období před imortalizací buněčné linie a před morfologickými změnami charakterizujícími maligně transformovaný fenotyp. Tato pozorování naznačují, že jde o příčinu a nikoli o následek maligní transformace.

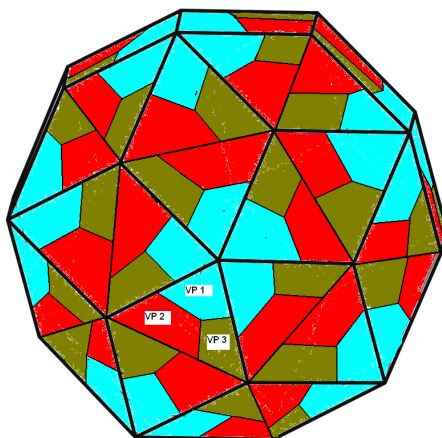
Mechanismem inhibice apoptózy indukované proteinem p53 je umožněno přežití buněk s poškozenou DNA a není blokován jejich vstup do nové G1 fáze buněčného cyklu. U lidských plně diferencovaných buněk však BKV T-antigen není schopen sám dokončit maligní transformaci buňky až k malignímu fenotypu a musí zde být interakce s dalšími onkogeny k dokončení této transformace (15).

Geny pozdní fáze kódují kapsidové proteiny. Polyomaviry nekódují vlastní DNA polymerázu a jejich replikace tudíž závisí na enzymové výbavě hostitelské buňky (2) (10) (11). Tohoto poznatku lze využít při hledání účinných antivirových preparátů.

2.4.2 Struktura virové kapsidy a vazebného místa na povrchu virionu

Kapsida virionu je složena ze 72 pentamerových podjednotek (kapsoméry). Kapsoméra vzniká interakcí tří kapsidových proteinů (VP1, VP2 a VP3). Zevní povrch virionu se skládá z 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1. Kromě VP1 tvoří kapsidu 72 molekul proteinů VP2 a VP3, které jsou za běžných podmínek skryty uvnitř kapsidy a nejsou přístupné např. vazbě protilátek (16).

12 pentamerových a 60 hexamerových morfologických subjednotek dávají dohromady ikosahedrickou kapsidu s T=7d typem symetrie (17) (obr.1).



Obr.1. Schéma tvaru virionu a uspořádání VP proteinů

Pentavalentní i hexavalentní pentaméry jsou spojené pomocí C-terminálních ramen (obr. 3). Každá kapsomera poskytuje 5 vazebných ramen a 5 jich získává od kapsoméry sousední. Tyto vazby jsou stabilizovány disulfidickými můstky a Ca^{2+} ionty. Jediná změna mezi volnou a vázanou VP1 podjednotkou je strukturální změna na jejím N-terminálním konci, který formuje šroubovici, jenž fixuje sousední C-terminální rameno. Ve volném VP1 pentameru má tato část strukturu β řetězce, který je paralelní s G řetězcem a drží pohromadě skupiny na začátku C-terminálního ramene. Jedno z vysvětlení funkce této struktury je navádění C-terminálního ramene ven z „vlastní“ subjednotky a jeho směřování k té sousední, což fixuje sousedící VP proteiny a zabraňuje předčasnému rozpadu virionu.

Tři sousední VP1 proteiny formují vazebné místo pro interakci virionu se specifickými receptory na povrchu hostitelské buňky, konkrétně v případě SV40 se vážou na dvě ramena gangliosidu GM1 (16) (18). Strukturální analýza ukázala, že gangliosid GM1 se váže na SV40 VP1 v mělkém žlábkovém tvořeném BC-, DE- a HI- kličkami. α -5-N-acetylové řetězce neuraminidové kyseliny (NeuNAc) interagují se zbytky z HI- a BC1-kliček jednoho monomeru (tzv. kapsa 1). Navíc byly ještě popsány interakce mezi s BC2-kličkou, která je umístěna v sousedství ve směru hodinových ručiček. Gal-(β 1,3)-GalNAc rameno interaguje s HI-, BC2 a DE-kličkami, které jsou umístěné ve VP1 molekule v protisměru hodinových ručiček a tvoří tzv. kapsu 2. Síla vazby VP1-GM1 je velmi nízká (K_d 1-5mM), což je pravděpodobně zapříčiněno přítomností repetitivních vazebných míst. GM1 je přítomen pouze u primátů, zatímco u člověka připadá v úvahu komplex polyomavirové VP1 s GD1b a GT1b, jehož struktura zatím nebyla popsána (19).

Protein VP1 rovněž interaguje s HLA proteiny 1. třídy a s O-vázanými glykanovými molekulami. Hraje proto nejdůležitější úlohu v humorální imunitní odpovědi při polyomavirové infekci (2).

2.5 Průnik polyomavirů do buňky a jejich interakce s nitrobuněčnými procesy

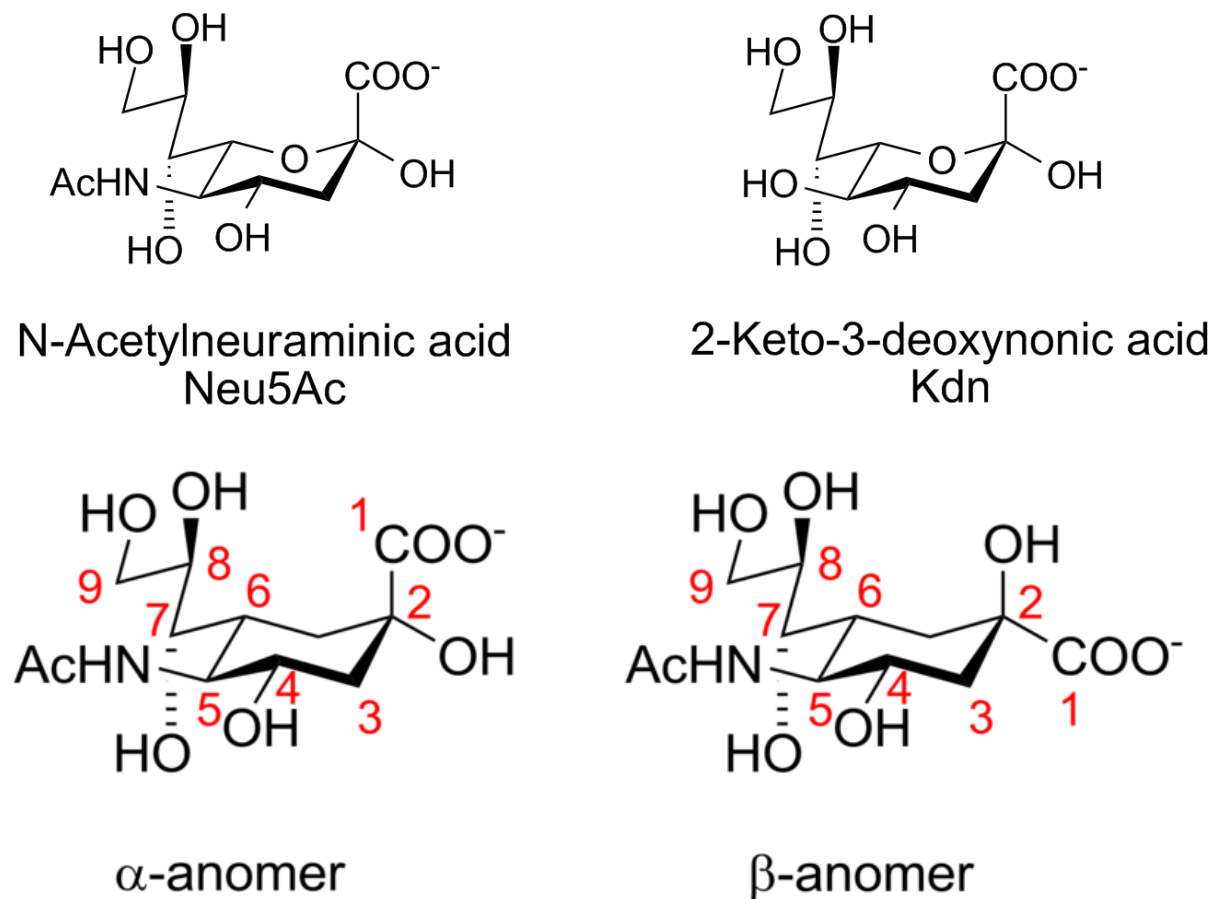
2.5.1 Polyomavirové receptory na povrchu hostitelských buněk a vstup viru do buňky

Vstup viru do buňky je schématicky rozdělen do tří fází: adsorpce, penetrace a „uncoating“. Pro úspěšnou adsorpci vyžaduje BK virus přítomnost sialové kyseliny (resp. sialylovaných oligosacharidů) (16) (18) (20), které jsou součástí gangliosidů GD1b a GT1b na povrchu cytoplasmatické membrány hostitelské buňky. Oba tyto gangliosidy mají v poloze α -(2-3) vázané dva zbytky sialové kyseliny a jsou přirozenými receptory BK virů (20). BKV vyžaduje k navázání a vstupu do buňky pouze α -2,3 vázanou sialovou kyselinu (21), zatímco např. JCV využívá α -2,3 i α -2,6 vázanou sialovou kyselinu jako receptor ke vstupu do permissivních gliálních buněk (22). SV40 využívá jako receptor gangliosid GM1 a myší polyomavirus (mPyV) gangliosid GD1a (23). Vazba na specifický receptor velmi pravděpodobně určuje další směřování internalizovaného virionu v buňce (24).

Sialové kyseliny jsou přítomné na povrchu všech buněk u vyšších obratlovců. Sialylace je terminální modifikace glykolipidů a glykoproteinů. Sialové kyseliny mohou tvořit vazbu s různými monosacharidy prostřednictvím glykosidických vazeb. Funkčně slouží sialylace k zajištění soudržnosti sousedících buněk prostřednictvím specifických receptorů, podílí se na regulacích v imunitním

systému, na plasticitě neuronů či na mechanismu glomerulární filtrace (25). Chemicky tvoří základ sialových kyselin jádro s 6 glykosidickými prstenci, které mají navázané několik funkčních skupin (hydroxylovou typickou pro všechny karbohydráty na C2, dále pak N-acetylovou skupinu na C5 a glycerolový řetězec na C6) (obr. 2).

Obr. 2. Sialové kyseliny



Mnoho patogenů využívá sialové kyseliny jako bránu vstupu do buňky, patří mezi ně některé druhy virů (např. paramyxoviridae) i bakteriální toxiny patřící ke klostridiových neurotoxinům a AB5 skupiny. Nejznámější sialová kyselina je u člověka N-acetyl neuraminidová kyselina (NeuNAc). Využívá ji např. Influenza virus A, kdy při vstupu do buňky tvoří komplex virový hemagglutinin (HA) s oligosacharidem, který má v poloze α -2,3 a α -2,6 vázanou NeuNAc (26).

U mPyV tvoří VP1 oligosacharidový komplex vazbu s fragmentem gangliosidu GD1a (27) a u SV40 VP1 interaguje s gangliosidem GM1 (19). Permisivita buňky pro infekci polyomaviry je mimo jiné

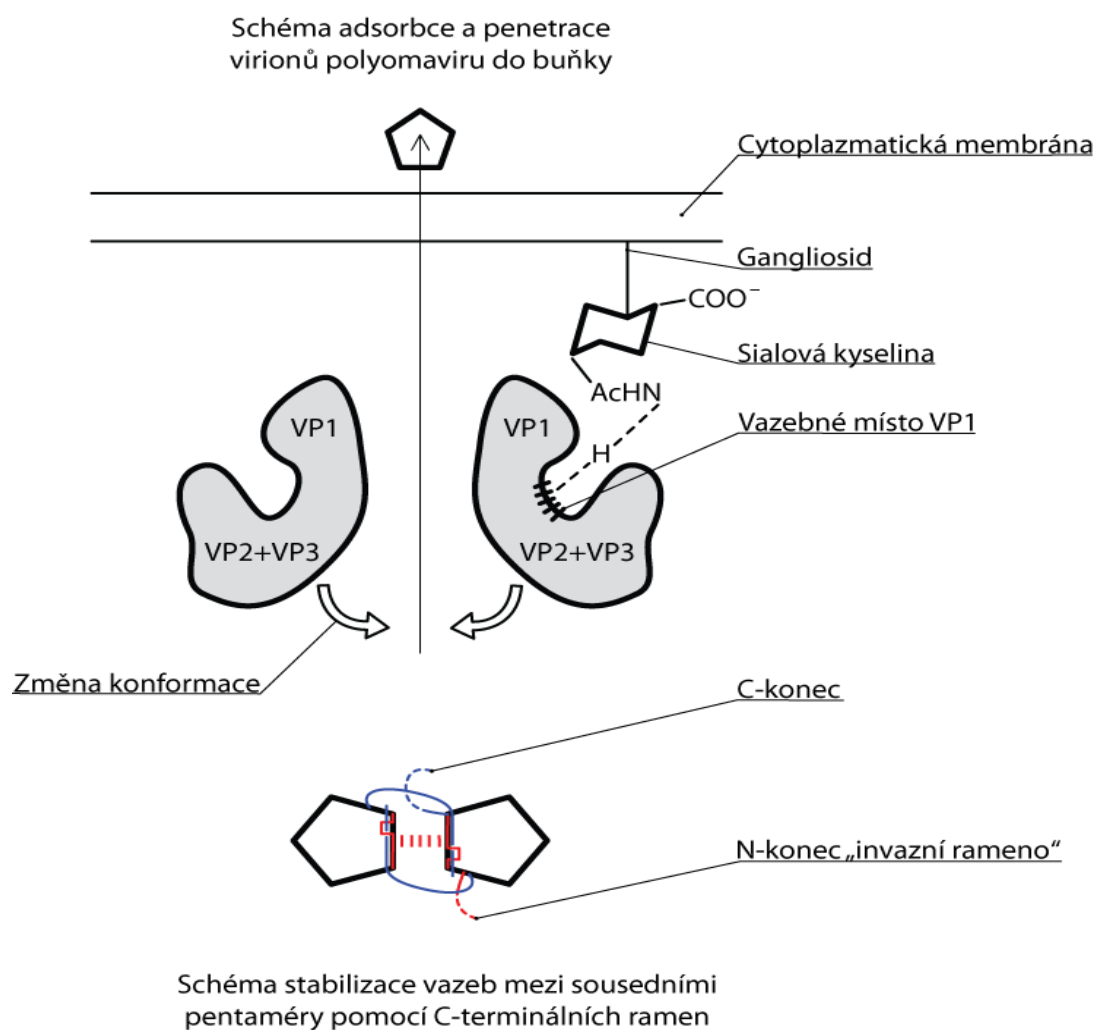
podmíněna také aktivitou kinázy skupiny Abl, protože Abl-kináza snižuje odbourávání gangliosidů v cytoplasmatické membráně inhibicí aktivity sialidázy a reguluje tak počet gangliosidů nutných k vazbě viru (28).

K vazbě na receptor viriony většinou rozpoznávají karboxylovou funkční skupinu a vytvářejí vodíkové můstky s N-acetylovou skupinou. Pouze některé viry (např. SV40 VP1, Influenza HA a Rotavirus VP8) se vážou na principu tvarové komplementarity na glycerolový řetězec a vytváří vodíkové můstky. Většina virů také zvýrazní prohlubeň v oblasti vazebného místa, což změní polohu methylové skupiny vázané na N-acetylové skupině. Když jsou exponovány všechny vazebné skupiny, je vznik vazby podmíněn především polaritou prostředí. Polární non-kovalentní interakce jsou totiž velmi slabé a vodíkové můstky mezi sialovými kyselinami a proteiny lze snadno nahradit kontaktem mezi molekulami vody a proteinovými atomy, aniž by došlo ke změně energetického stavu komplexu. Nepolární van der Waalsovy interakce mezi karbohydráty a proteiny jsou rovněž velmi slabé a jejich síla klesá se zvyšující se vzdáleností. Síly vazeb jsou stanovené experimentálně milimolárními afinitami protein-glykanových komplexů.

Vazebná místa receptorů jsou poměrně „mělká“ a nevylučují tudíž navázání nesprávných ligandů. Specifická vazba je zajišťována tím, že pouze správný ligand se váže kromě sialových kyselin a specifických gangliosidů i s ostatními ko-receptory. Konkrétně u virů Influenza HA, mPyV VP1 a SV40 VP1 bylo prokázáno, že samotná vazba na sialovou kyselinu není dostatečná a ke vstupu virionu do buňky jsou nutné interakce s dalšími sacharidy. Jako koreceptor JCV byl identifikován serotoninový receptor (5HT-2a), mezi koreceptory SV40 patří HLA proteiny I. třídy a pro mPyV byl identifikován $\alpha 4 \beta 1$ integrin. U BKV nebyly ko-receptorové molekuly doposud identifikovány (18).

Recentní studie naznačují, že ko-receptorů je pravděpodobně více. Dle Borissova et al. jsou pravděpodobně některé koreceptory lidských polyomavirů společné s koreceptory viru HIV. U HIV pozitivních pacientů, kteří byli infikováni zároveň polyomaviry, byla zaznamenána vysoká frekvence wt (divoké) formy chemokinových receptorů CCR5 (92% u BKV nebo JCV pozitivních, 100% u BKV i JCV pozitivních) a CCR2 (75% u BKV a 67% u JCV). Pokud byly tyto receptory mutované, bylo u jejich nositelů signifikantně nižší riziko PCR-pozitivní koinfekce polyomaviry. Tento výsledek může naznačovat, že receptory CCR5 a CCR2 ve své nemutované formě usnadňují vstup polyomavirů do buňky a přechod v lytickou formu infekce (29).

Po navázání virionu na příslušné receptory dojde ke konformačním změnám receptorů i kapsidových proteinů. Tyto děje aktivují fúzi membrán, čímž je umožněna penetrace virionu do buňky (obr. 3).



Obr. 3. Schéma adsorpce a penetrace virionu do buňky a schéma stabilizace vazeb mezi sousedními pentaméry pomocí C-terminálních ramen

Vazebné místo SV40: interakce sialové kyseliny a Ser68, Thr276, Ser274, Asn272 – VP1

Vazebné místo mPyV: interakce sialové kyseliny a Asn 293, His298, Gly78, Arg77, Tyr72 – VP1

Upraveno dle Neu U et al. (18)

Schéma stabilizace vazeb mezi sousedními pentaméry pomocí C-terminálních ramen dle (27)

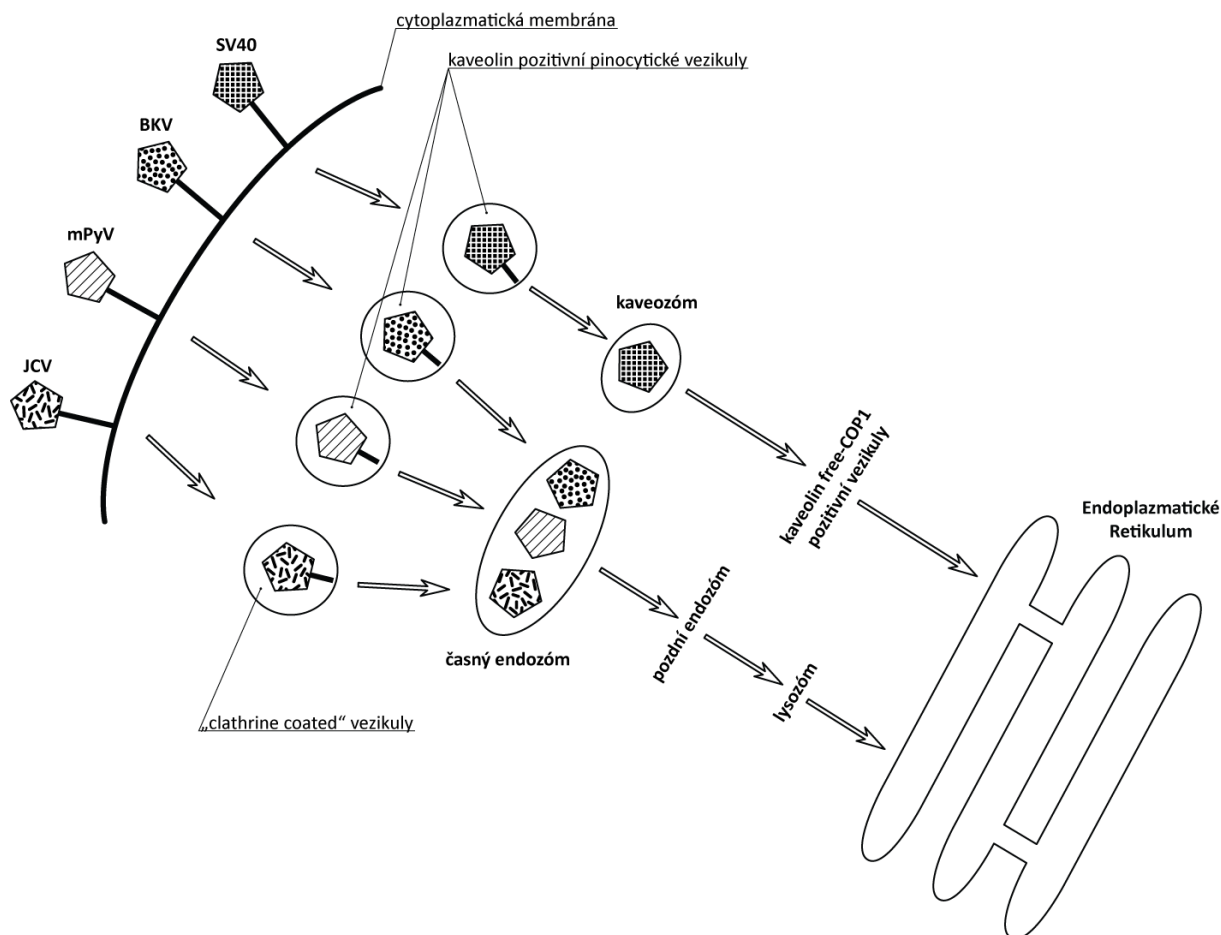
2.5.2 Nitrobuněčný transport polyomavirů

2.5.2.1 Transport virionu z povrchu buňky do endoplazmatického retikula

Mechanismus transportu z buněčného povrchu do endoplazmatického retikula (ER) byl podrobně studován u mPyV. Transport probíhá mechanismem kaveolární endocytózy. Virion je internalizován v komplexu s gangliosidovým receptorem a poté v caveolin-pozitivních pinocytických vezikulách po reorganizaci aktinových filament za pomoci mikrotubulů transportován do endolysozomálního kompartmentu (časný a pozdní endozóm – lysozóm) a poté do ER. Nízké pH uvnitř endolysozómu zajišťuje konformační změny VP proteinů, které usnadní následující konformační změny VP proteinů v ER nutné pro penetraci z ER do cytosolu (30) (31). Transport virionu z endolysozómu do ER je řízen gangliosidovým receptorem GD1a. Vazba na gangliosidy a po internalizaci směřování do ER jsou společné i pro některé bakteriální toxiny (32), což implikuje, že signál k tomuto směřování je zakotven ve strukturálních nebo fyzikálních vlastnostech gangliosidů (např. hydrofóbní lipidová struktura) (24).

Produktivní infekce buňky lidskými JC a BK viry také vyžaduje nízké pH endolysozomálního kompartmentu (33) (34), což implikuje, že endolysozom je rovněž součástí jejich nitrobuněčného směřování. Naproti tomu průběh infekce virem SV40 nezávisí na hodnotě pH endolysozómu (33). Předpokládá se proto, že SV40 je po internalizaci transportován do pH neutrálního kaveozómu a poté prostřednictvím caveolin-free COP1 pozitivních vezikul do ER (35) (Obr.4).

Transport polyomavirů uvnitř buňky je umožněn jejich zásahem do regulace nitrobuněčných pochodů (např. SV40 aktivuje kináz-dependentní signalizaci, která zvýší novotvorbu dynaminu a intenzitu de- a re-polymerizace aktinu během internalizace caveol (36)).



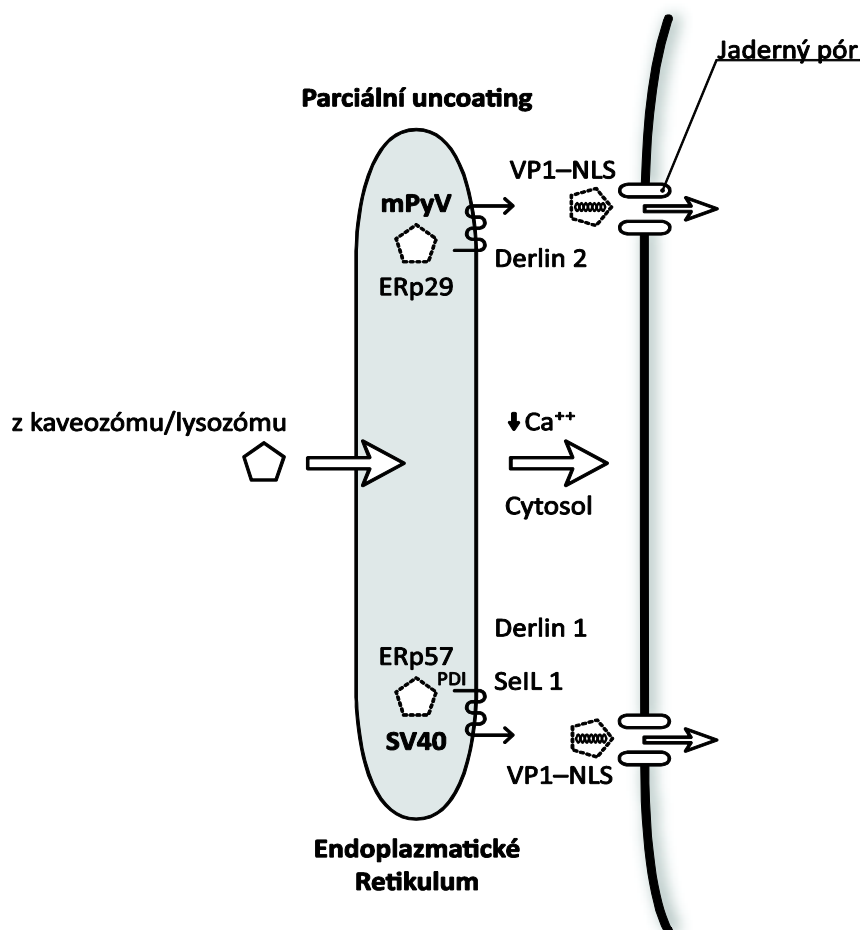
Obr. 4. Schéma transportu polyomavirů v buňce (upraveno dle Sapp M, Day PM (16))

2.5.2.2 Děje probíhající v endoplazmatickém retikulu a vstup virové DNA do jádra

V ER proběhne parciální „uncoating“. Celý proces v ER začíná změnou konformace kapsidových proteinů, která je na molekulární úrovni dána interakcí VP1 s ERp29 proteinem. ERp29 protein patří do rodiny PDI proteinů s protein disulfid-isomerázovou aktivitou, která je dána přítomností CXXC motivů v oblasti thioredoxinových domén. Tyto domény zajišťují redukci i oxidaci disulfidických vazeb nově syntetizovaných proteinů (37).

Výsledkem této interakce je uvolnění trypsin-senzitivní oblasti VP1 proteinu (23). Konformační změna navodí expozici trypsin-senzitivních oblastí rozštěpení vazeb mezi C-terminálními rameny VP1 a tím se destabilizují pentamer-pentamer vazby, které udržují virion pohromadě. Rozštěpení těchto vazeb umožní virové částici navázat se na membránu ER a penetrovat strukturou lipidové membrány. Částečně destabilizovaný virion mnohem snadněji pronikne do cytosolu, kde signální sekvence pro

transport do jádra (nuclear localization signals-NLS), která je součástí VP1, jej nasměruje do jádra cestou jaderných porů (16) (18). Jakmile tedy virion vstoupí do ER, je rozpoznán kontrolními mechanismy ER a předložen PDI proteinům. Interakcí s PDI proteiny dojde k izomerizaci specifických disulfidických vazeb, které destabilizují kapsidu virionu. Destabilizovaný virion je poté rozpoznán ER asociovanými degradačními proteiny ze skupiny ERAD (Derlin 1,2 a SelL1) jako protein s chybnou strukturou (misfolded protein) a je transportován z ER do cytosolu, kde se působením prostředí s nízkou koncentrací Ca^{2+} iontů dokončí destabilizace virionu. Rozvolnění pentamer-pentamerových vazeb dojde k uvolnění NLS, které jsou součástí kapsidových proteinů. I přes rozvolnění vazeb zůstávají kapsidové proteiny vázané k virovému mini-chromozomu a komplex virový protein+mini-chromozóm je transportován cestou intaktních nukleárních porů. DNA se tak dostává do jádra (38) (39) (40) (Obr.5).



Obr.5. Schéma dějů probíhajících v ER a přechod polyomavírové DNA do jádra (Dle Neu U et al. (18))

NLS – nuclear localization signals

2.5.3 Latence a interakce polyomavirové DNA s jadernými doménami

2.5.3.1 Episomální latence polyomavirové DNA

Po vstupu do jádra persistuje polyomavirová DNA s tzv. episomální latencí. Při episomální (extrachromozomální) latenci je virová DNA patrná jako lineární nebo laniární struktury vznášející se v jádře nebo v cytoplasmě cílových buněk. Genetický materiál viru je při episomální latenci na rozdíl od tzv. provirové latence velmi náchylný k degradaci ribozymy a dalšími mechanismy chránícími buňku před cizí DNA. Episomální latenci vykazují kromě polyomavirů ještě další DNA viry, např. herpes viry, EBV, cytomegaloviry nebo papilomaviry (41). Tohoto poznatku lze využít v genové terapii, neboť základním požadavkem je přenést do buňky nový gen, který bude co nejdéle persistovat v buňce a bude probíhat jeho replikace aniž by se tento nový gen včlenil do jaderné DNA (42). První stabilní episomální vektor byl založen na sekvencích odvozených od BK viru (43).

2.5.3.2 Interakce polyomavirové DNA s jadernými doménami

Pokud není pro persistenci nutný vstup virové DNA do jádra, resp. její integrace do genomu buňky, vyhne se interakci s ND10 doménou, která aktivuje antivirovou obranu buňky zprostředkovanou interferonem α . Během aktivní replikace BKV DNA je však interakce se subnukleární ND10 doménou klíčová. ND10 doména je složena ze 3 subjednotek a má mnoho funkcí, např. při regulaci apoptózy, odpovědi na stresové podněty, senescenci, ubiquitinaci či regulaci genové exprese. Vzhledem k jejím mnoha funkcím byla studována i její role v procesu onkogeneze. ND10 doménu tvoří PML protein, hDaxx nukleární protein a protein sp100. Funkce PML proteinu byla popsána u pacientů s akutní promyelocytární leukémií, kteří mají reciprokou chromozomální translokaci, při níž dochází k fúzi PML proteinu s nukleárním receptorem pro kyselinu α -retinovou. PML, známý také pod názvem TRIM protein, obsahuje funkční skupiny „RING finger“, jednu nebo dvě „B-boxes“ (oblasti bohaté na cystein/histidin) a tzv. α -helikální „coiled-coil doménu“. Tato oblast umožňuje PML proteinu interagovat s ostatními regulačními proteiny a má i homo-oligomerizační funkci. Tato funkce je klíčová pro strukturu ND10 domény i PML proteinu jako supresoru buněčného růstu a maligní transformace. hDaxx je vysoce evolučně konzervovaný jaderný protein. Obsahuje domény bohaté na serin/prolin/threonin, acidickou doménu, „coiled-coil region“ a dvě párové amfipatické šroubovice. Hraje roli v regulaci apoptózy a genové exprese. V regulaci genové exprese funguje jako ko-represor transkripce. Inhibuje tedy expresi genů mechanismem suprese aktivity transkripčních faktorů, konkrétně např. Ets-1, NF- κ B, Pax3, proteinů z rodiny p53, glukokortikoidních, mineralkortikoidních a androgenních receptorů. Protein Sp100 je rovněž důležitý při regulaci genové exprese a při inhibici

buněčných i virových promotorů, jeho hlavní funkcí se ovšem zdá být právě rozpoznávání cizorodé DNA mechanismem preferenční interakce s non-methylovanými CpG oblastmi, neboť DNA virového původu je hypo-methylována. Sp100 a PML proteiny jsou interferon-inducibilní.

ND10 doména však zároveň hraje klíčovou roli při replikaci BKV a „assembly“ virionu, neboť amplifikace virové DNA indukovaná T-antigenem je podmíněna interakcí T-ag s ND10 doménou. DNA asociovaná s ND10 doménou je preferenčně jednovláknová, což může souviset s nutností využít schopnost DNA-repair mechanismů ND10 domény. I vznik nových virionů je s nejvyšší pravděpodobností vázán na interakci s ND10, neboť byla prokázána významná akumulace VP1, VP2, VP3 i virion-like partikulí v těsné blízkosti ND10. Dle posledních výzkumů bylo zjištěno, že masivní produkce nových virionů vede k poškození struktury tohoto subnukleárního proteinu, což vede společně s dalšími mechanismy k zániku hostitelské buňky během aktivní replikace BK viru (44).

Pro úspěšnou replikaci virové DNA a novotvorbu kapsidových proteinů je esenciální zabránit předčasné apoptóze infikované buňky. Děje se tak manipulací DNA-repair mechanismů, zásahy do regulace buněčného cyklu, inhibicí caspáz a/nebo produkcí virových „analog“ proteinů rodiny Bcl-2 (45).

2.5.4 Replikace polyomavirové DNA a transkripce virových proteinů

Mechanismus replikace polyomavirové DNA byl podrobně popsán u viru SV40 (46). Bezprostředně po průniku polyomavirové DNA do jádra začíná transkripce tzv. časného regionu polyomavirového genomu, který zahrnuje mimo jiné i geny kódující „large tumor antigen“ (TAg). Replikace virové DNA je zahájena v okamžiku, kdy TAg interaguje s počátkem replikace SV40 (SV40 origin of replication-ori). Poté se ATP naváže na TAg ATPázovou doménu čímž zvýší afinitu a tím dovolí asociaci TAg s *ori* a zároveň katalyzuje TAg hexamerizaci a následně interakci dvou hexamérů (dodecamerizaci) (47). TAg hexaméry se poté částečně mísí s DNA (48) a asociují s dalšími proteiny, které se podílejí na replikaci, tj. DNA topoisoméráza I (Top1), replikační protein A (RPA) a DNA polymerázová α -primáza (pol-prim) (49).

Jakmile byla replikace zahájena, nastane tzv. „polymerázový switch“ a pol-prim je nahrazena replikačním faktorem C (RFC), proliferating-cell nukleárním antigenem (PCNA) a DNA polymerázou- δ (50) (51).

V závěrečném kroku TAg dodecamer působí jako bi-direkční helikáza, která hydrolyzuje ATP a rozvolňuje helikální strukturu DNA v průběhu replikace (52).

Další oblast v TAG důležitá pro replikaci virové DNA v infikovaných buňkách je J-doména, která je bohatá na N-konce (TAG's *N-terminus*) (53). J domény jsou vysoce konzervované struktury, prostorově uspořádané do čtyř helikálních svazků (four-helical bundles). Nejčastěji je nacházíme v Hsp40 molekulárních chaperonech. Funkcí J domény je zprostředkování interakce Hsp40 a Hsp70 chaperony, čímž dojde ke stimulaci Hsp70 ATPázové aktivity a k posunutí polypeptidového substrátu z Hsp40 směrem k Hsp70 (54). TAG J doména interakcí s Hsp70 napomáhá disociaci komplexu transkripčního faktoru Rb-E2F (55), což iniciuje buněčný cyklus. Úspěšné vytvoření komplexu TAG-Hsp70 je také klíčové při TAG zprostředkované buněčné transformaci (56). Hsp70 navíc hraje nezanedbatelnou roli při „uncoating“ viru (57) a naopak v mechanismu „assembly“ virionu v pozdní fázi infekce interakcí s kapsidovými proteiny (58).

Strukturální proteiny (V1, VP2 a VP3) jsou syntetizovány v pozdním stádiu virové infekce a využívají k tomu proteosyntetický aparát v cytoplasmě hostitelské buňky. Vytvořené VP proteiny jsou poté importovány do jádra (59).

2.5.5 „Assembly“, maturace a uvolnění nových virionů

Základní paradigma kompletování (assembly) virové partikule se týká krystalizace VP podjednotek, které tvoří kapsidu na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi jednotlivými strukturálními proteiny. Jejich uspořádání tak nemusí být geneticky kódováno. Termodynamicky stabilní virové partikule tak mohou vzniknout i *in vitro* interakcí kapsidových proteinů a nukleových kyselin (60). Mechanismus self-assembly závisí na síle přitažlivých vazeb mezi proteinovými kapsoméry, které mohou být dle zákonů termodynamiky ovlivněny změnou reakčních podmínek, tj. např. změnou pH nebo koncentrace Ca^{2+} (61).

Práce ze 70.let 20.století publikovaly další základní poznatek, že k assembly viru SV40 dochází již uvnitř jádra interakcí a organizací kapsomer okolo virového minichromozomu, spíše než že by DNA byla inkorporována do již preformované kapsidy (62). Interakce se chaperony hraje v tomto mechanismu důležitou roli (63).

Ve studiích autorů Clever et al. (64) a Li et al. (65) měly všechny tři kapsidové proteiny nespécifickou vysokou afinitu k DNA, což vedlo k nastolení otázky, jak v prostředí velkého množství buněčného chromatinu rozpoznají kapsidové proteiny DNA virového minichromozomu. To vedlo k identifikaci „packaging“ signálu v genomu SV40 (ses) (66). Ses je lokalizován v regulačním regionu virového genomu (67) v oblasti bohaté na „GC-boxes“, což zahrnuje šest GGGCGG elementů přítomných v

21pb dlouhých repetitivních sekvencích, které vážou transkripční faktor Sp1 (68). Sp1 a ses společně interagují a atrahují tím kapsoméry k SV40 minichromozómu.

Jak produktivní infekce buňky pokračuje a v jádře je již dostatečné množství kapsidových proteinů, je virová DNA prostřednictvím interakce ses s Sp1 preferenčně nucena interagovat s kapsidovými proteiny za současného „vypnutí“ časného i pozdního promotoru a vytvoření „nukleárního centra“ pro assembly (69).

Během maturace virionu jsou nukleozómy redistribuovány okolo virového minichromozómu (70). Nukleozomální reorganizace je spouštěna kapsidovými proteiny. Děje se tak odstraněním transkripčních a replikačních faktorů z regulačního regionu. Např. Sp1, který hraje hlavní roli v procesu assembly, již není přítomen ve „zralém“ virionu (71). Závěrečná kondenzace minichromozómu je pravděpodobně konformačně-energeticky závislý proces, který je řízen interakcemi a vazbami kapsoméry ve struktuře ikosahedrické kapsidy (72).

Lýze buňky indukována uvolněním nově syntetizovaných virových partikulí byla zpočátku považována za výsledek souhry nesespecifických dějů (následek „vyčerpání“ proteosyntetického aparátu a poškození subnukleárních struktur při excesivní proteosyntéze a replikaci virových součástí), což způsobí nevratné změny v permeabilitě buněčné membrány. Nicméně poznatek, že rozpad buňky je „načasován“ a dochází k němu vždy až po dokončení assembly nových virionů implikuje, že cytolytické viry mají mechanismus, který zajišťuje, že k indukci buněčné smrti dojde až ve správný čas.

Tento mechanismus byl popsán v práci Daniels et al. (73), který identifikoval nový gen viru SV40, nazvaný VP4, který je exprimován velmi pozdě (24h po genech pro strukturální proteiny VP1, VP2, a VP3). Právě protein VP4 je zodpovědný za správné načasování lytického uvolnění nových funkčních virových partikulí, které umožní efektivní šíření infekce virem SV40 v kultuře.

2.6 BK-virus specifická imunita

Při prvním setkání s BKV primoinfekce aktivuje nejprve nespecifické imunitní reakce, které jsou následované tvorbou specifických protilátek (IgM a IgG) a antigen (HLA)-restricted T lymfocytů. Po zpracování antigenů BK viru antigen prezentujícími buňkami vzniká populace epitop-specifických CD4 + T-lymfocytů. Tyto CD 4 + T-lymfocyty jsou aktivovány interakcí s antigeny BK viru vázanými na HLA II. třídy a řídí produkci cytokinů, které stimulují makrofágy, CD8+ T-lymfocyty (pomocí interakce s T-helper 1.třídy) a B-lymfocyty (pomocí interakce s T-helper 2.třídy). Virus-specifické cytotoxické

CD8+ T-lymfocyty indukují po rozpoznání virových antigenů na povrchu buňky lýzu infikované buňky pomocí perforin-granzymů. Po zvládnutí infekce většina cytotoxických T-lymfocytů zaniká mechanismem apoptózy, ale část jich zůstává v poolu paměťových buněk. Schopnost reaktivace a replikace subpopulace BKV-specifických paměťových buněk je klíčová pro kontrolu latentního stádia virové infekce. Monitorace interferon γ -secernujících T-lymfocytů ukázala, že jejich počet nepřímě úměrně koreluje s BK virémií a virurií (74). Dynamika BKV-specifické buněčné imunity je tedy důležitým ukazatelem rizika vzniku BKVN i šance na snížení již probíhající replikace BKV. Studium epitop-specifických interferon γ produkujících T-lymfocytů bylo zjištěno, že CD4+ T-lymfocyty byly nejčastěji VP1-specifické, zatímco CD8+ T-buňky byly cílené převážně proti large-T antigenu (75).

2.7 BKVN po transplantaci ledviny

Prevalence BKVN u pacientů po transplantaci ledviny dosahuje v některých centrech 1%-10%, což odpovídá incidenci 8% vypočtené dle Kaplan-Meiera. Většina případů BKVN je diagnostikována během prvního roku od transplantace, ale více než čtvrtina případů se rozvine později (76) (77). Vasudev et al. rovněž prokázal, že většina biopsicky potvrzených nálezů BKVN byla v prvním roce po transplantaci (median 318 dní, rozsah 48-1356 dní) (78).

BKVN patří k častým příčinám selhání štěpu ledviny, neboť u 30-60% pacientů s prokázanou BKVN dochází k progresivnímu zhoršování funkce štěpu a k jeho selhání (78) (79). Dle Hirsche et al. (76) došlo k selhání štěpu dokonce až u 80% pacientů s biopsicky prokázanou BKVN.

2.7.1 Rizikové faktory BKVN

Míra rizika zvýšené replikace BK viru (a následného rozvoje BKVN) je v obecné rovině dána souhrou faktorů, které zahrnují stav pacienta, stupeň imunosuprese, stav transplantovaného orgánu a virus samotný. Za nejdůležitější rizikový faktor vzniku BKVN je v současné době považována imunosupresivní terapie (79) (80).

Užití antithymocytárních preparátů (konkrétně ATG) k indukční imunosupresi nebylo asociováno se signifikantně vyšším rizikem BK virémie, virurie nebo BKVN (81), dle Prince et al. ale bylo použití ATGAM® k indukci prokázáno jako rizikový faktor vzniku BKVN (82). Podání antilymfocytárních preparátů k terapii akutní kortikorezistentní rejekce bylo naopak silně asociováno s nárůstem replikace BKV (79) a to zvláště u pacientů, kteří užívali tacrolimus a mykofenolát mofetil (MMF) (80). Z imunosupresivních preparátů užívaných dlouhodobě po transplantaci (tzv. „maintenance immunosuppression“) se zdá být nejvyšší riziko BKV replikace pro kombinaci tacrolimus/MMF (80) (82). Dle Brennan et al. (81) nebylo spojeno vyšší riziko vzniku transientní BK virémie a virurie s užíváním tacrolimu (versus cyklosporin A (CyA)), ale persistující BK virémie byla pozorována u 7,5%

pacientů užívající tacrolimus a pouze u 1,5% pacientů léčených CyA. Nejnižší incidence BK virémie byla naopak spojena s kombinací CyA/MMF (81) (82).

Kromě imunosupresivní terapie patří k rizikovým faktorům dále vyšší věk, mužské pohlaví, bělošské etnikum, diabetes mellitus, negativní sérostatus před transplantací, vyšší počet HLA neshod mezi dárce a příjemcem a epizoda akutní rejekce a její léčba v prvním roce po transplantaci (80). Dle Bressollette-Bodin et al. patří mezi rizikové faktory i studená ischemie štěpu ledviny delší než 24 hodin (83).

2.7.2 Diagnostické metody BKVN

Z diagnostických metod se k průkazu replikace BK viru nejčastěji **v klinické praxi** používají následující:

2.7.2.1 Exfoliativní cytologie moči

Jedná se o cytologické vyšetření moči, kdy po fixaci ve formaldehydu a centrifugaci se vzorek barví dle Papanicolaua. Ve světelném mikroskopu lze poté pozorovat tzv. decoy buňky, což jsou epiteliie distálních tubulů a/nebo uroteliie se zvětšeným, nepravidelným, hyperchromním jádrem, jenž je vyplněno basofilními inkluzemi, které jsou obklopené chromatinem. Jádro má často až „vezikulární“ vzhled a mívá po obvodu projasnění – tzv. „halo“. Obraz nepravidelností jádra implikuje nádorové změny, proto „decoy“ – návnada. K dalším možnostem průkazu decoy-buněk patří imunohistochemické barvení nebo pozorování metodou fázově-kontrastní mikroskopie (84).

Tato metoda je semikvantitativní a hodí se zvláště ke skríninku rizikových pacientů. Maximum pozitivních nálezů bylo 16 týdnů po transplantaci ledviny (medián, rozsah 2-69týdnů). Negativní prediktivní hodnota vyšetření pro BKVN byla 99%, pozitivní prediktivní hodnota pro BKVN však pouze 29%. U většiny pacientů pozitivita decoy buněk o 4 týdny (medián) předcházela BK virémii a o 12 týdnů BKVN (80). V případě nepřítomnosti epiteliálních buněk ve vzorku však můžeme dostat falešně negativní výsledek, což výrazně snižuje atraktivitu tohoto vyšetření jako skríníngového testu.

2.7.2.2 Kvantitativní real-time PCR

Kvantitativní real-time PCR je molekulárně-biologická metoda, která slouží k enzymatické replikaci DNA. Touto metodou lze prokázat a kvantifikovat počet kopií DNA BK viru v plasmě a v moči.

Jedná se o cyklickou reakci, díky které je možno amplifikovat určitý námi vybraný úsek molekuly DNA. Nejprve je ovšem nutné provést extrakci DNA ze vzorku. K izolaci DNA je zapotřebí etanol, citrát sodný, hydroxid sodný a reagentie určené k lýze buněčných membrán a homogenizaci DNA.

Reagencie lyzující buněčné membrány jsou jednak na bázi detergentů (detergent + guanidin) (např. DNAzol®), které jsou netoxické, nebo obsahující fenol (např. TRI REAGENT® - RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT). TRI Reagent® obsahuje fenol a guanidin thiokyanát. Biologický vzorek je jím lyzován a homogenizován. Homogenát je po přidání chloroformu nebo bromochloropropanu a centrifugaci separován na „vodní“ a „fenolovou“ fázi. RNA zůstává pouze ve „vodní“ fázi, DNA v „interfázi“ mezi „vodní“ a „fenolovou fází“ a částečně ve „fenolové“ fázi a proteiny pouze ve „fenolové“ fázi. DNA je následně sekvenčně precipitována z „interfáze“ a „fenolové“ fáze etanolem, poté následuje promytí a solubilizace.

2.7.2.2.1 Extrakce DNA ze vzorku

Extrakci DNA lze schématicky rozdělit do čtyř kroků:

- 1. Homogenizace DNA:** Po přidání 1ml TRI Reagent®, chloroformu nebo bromochloropropanu a centrifugaci (2,000 g po dobu 5 minut při 4°C) dojde k rozdělení obsažených organických molekul ve vzorku do vrstev dle rozpustnosti (polarity) a molekulové hmotnosti. Pro izolaci DNA nás dále zajímá hlavně interfáze a fenolová fáze.
- 2. Precipitace DNA:** Precipitace DNA z interfáze a fenolové fáze za pomoci etanolu se provádí přidáním 0.3 ml 100% etanolu na 1 ml TRI Reagentu, který byl použit pro iniciální homogenizaci. Po důkladném promíchání se vzorek ponechá stát 2-3 minuty při pokojové teplotě. Poté následuje centrifugace 2,000 g po dobu 5 minut při 4°C. Opatrné odstranění zbytků vodní fáze je důležité pro kvalitu purifikované DNA.
- 3. Promývání DNA:** Peleta obsahující DNA se 2x promyje v roztoku 0.1 M citrátu sodného v 10% etanolu. Množství použitého roztoku se řídí množstvím TRI Reagentu použitého k iniciální homogenizaci (1ml:1ml). Při každém promývacím cyklu je důležité ponechat peletu v promývacím roztoku 30 minut při pokojové teplotě za periodického míchání. Poté vzorek centrifugujeme (2,000 g, 5 minut, 4°C). Následně suspendujeme DNA peletu v 75% etanolu (1.5-2 ml 75% etanolu na 1 ml TRI Reagentu), necháme opět odstát 10 - 20 min při pokojové teplotě za periodického míchání a následně centrifugujeme (2,000 g, 5 minut, 4°C). Tento etanol promyje DNA a zbaví peletu narůžovělé barvy.
- 4. Solubilizace DNA:** Nejprve je nutné odstranit etanolvý promývací roztok a nechat DNA peletu vysušit ponecháním zkumavek otevřených při pokojové teplotě po dobu 3-5 minut. Poté se peleta šetrně pomocí pipety rozpustí v 8 mM NaOH. Přidáním adekvátního množství 8 mM NaOH bychom měli docílit koncentrace DNA 0.2 - 0.3 µg/µl. Většinou se tak přidává

0.3 - 0.6 ml 8 mM NaOH do DNA izolované z 50 - 70 mg tkáně nebo ze 107 buněk. Lehce alkalické pH roztoku zajišťuje dobré rozpuštění DNA pelety. V tomto stádiu extrakce DNA vzorek stále obsahuje nerozpustné složky (např. fragmenty buněčných membrán atd.). Tento materiál se odstraní centrifugací (12,000 g po dobu 10 minut při 4°C). Centrifugací získaný supernatant obsahující DNA se přesune do nové zkumavky. Jeho vysoká viskozita signalizuje přítomnost DNA s vysokou molekulovou hmotností.

Po úpravě pH (HEPES – množství dle jeho koncentrace a požadovaného výsledného pH) lze rovnou přikročit k provedení PCR nebo je možno vzorek DNA zamrazit na -80 °C (85).

Celý proces extrakce DNA je vysoce náročný na čistotu pracovního prostředí (riziko kontaminace vzorku DNA z prostředí) a na přesnost jeho provedení. Jakákoli nepřesnost (nedostatečné odstranění „vodní“ fáze, nedodržení vypočteného množství reagensů či špatné promytí) může způsobit nedostatečnou extrakci DNA, oslabení vazby sondy/primerů k templátové DNA nebo inhibici PCR reakce.

Mezi nejčastější mechanismy PCR inhibice patří jednak kovalentní vazba s DNA, přímé ovlivnění aktivity DNA polymerázy nebo vyvázání kofaktorů nutné pro její působení (hlavně Mg^{2+}). K hlavním PCR inhibitorům proto patří: žlučové kyseliny, komplexní polysacharidy, kolagen, hem, hemoglobin, melanin a eumelanin, myoglobin, proteinázy, Ca^{2+} , urea, laktoferrin, krev, Imunoglobuliny (zvl. třídy IgG), triglyceridy a sérové bílkoviny. PCR inhibuje i nadbytek solí použitých při purifikaci DNA (KCl, NaCl, deoxycholát sodný), dále pak detergenty (např. sarkosyl - lauroyl sarcosinát sodný) nebo SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (86).

Pro zvýšení přesnosti a minimalizaci chyb je proto doporučováno použití firemních izolačních kitů, které dodají dané množství jednotlivých reagensů již připravené ve zkumavkách. Tím se minimalizuje počet kroků, které musíme provést, a při přesném dodržení návodu i riziko chyby. V praxi se proto spíše než manuální izolace DNA používají kity založené na principu extrakčních kolonek (tzv. spin column kits) nebo purifikace DNA pomocí magnetických partikulí na bázi magnetického oxidu křemičitého (např. NucliSens®easyMAG™) (87).

2.7.2.2.2 PCR reakce

K provedení samotné PCR je zapotřebí purifikovaná DNA, pufovací roztok s termostabilní DNA polymerázou (např. Taq polymeráza), oligonukleotidové primery, sonda (oligonukleotid komplementární k vyšetřované sekvenci-templátu), čtyři druhy dNTP (deoxynukleotidtrifosfáty),

kofaktor $MgCl_2$ a enzym zajišťující dekontaminaci cizorodou DNA (např. UDG - Uracil-DNA-glykosyláza), která excizí uridinů kontaminující DNA destabilizuje a tím nedochází k její amplifikaci. Pro kontrolu správnosti průběhu reakce se přidávají tzv. pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontroly (exogenní a endogenní) jsou vzorky, které obsahují dané množství neinfekční syntetické DNA a PCR reagenty. Detekujeme jimi kvalitu použitých reagentů (zda došlo k extrakci DNA a zda probíhá amplifikace), přítomnost inhibitorů a dále slouží ke standardizaci množství vyšetřované DNA ve vzorku (tvorba kalibrační křivky). Negativní kontroly (tzv. „No Template Control“ - obsahuje pouze vodu a reakční směs a „No amplification control“ - obsahuje všechny komponenty kromě DNA polymerázy) slouží k detekci dimérických primerů, kontaminace a degradace sondy (87).

Reakce začíná denaturací, kdy po kompletním rozvolnění vyšetřované DNA vzniknou vazebná místa pro primery. Počáteční denaturace se provádí při 95 °C po dobu obvykle 2 až 5 minut.

Po ukončení počátečního tzv. UNG (např. UDG) kroku a denaturace následují **cykly PCR**, které se skládají ze tří kroků:

1. **Denaturace** – reakční směs se zahřeje na teplotu 94 – 96 °C. Dochází k relaxaci a rozvolnění molekuly dsDNA do dvou ss molekul - vzniká tzv. templátová DNA.

2. **Navázání primerů (annealing)** – ochlazení reakční směsi na 50 – 65 °C umožní navázání primerů k jejich komplementárním úsekům na ssDNA, čímž označí DNA polymeráze „začátek“ a „konec“. Teplota určuje specifickou vazbu primeru na templát a stanovuje se empiricky.

3. **Polymerizace** – zahřátím reakční směsi na 70 – 72 °C se umožní navázání DNA polymerázy na místo označené primerem (tzv. „forward primer“). Poté následuje samotná polymerizace, tj. novotvorba oligonukleotidů dle sekvence templátové DNA, která je komplementární se sondou, až k dalšímu primeru označujícímu konec replikace (tzv. „reverse primer“) za pomoci volných dNTP. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus reakce. Nárůst produktů reakce je proto exponenciální.

Tento cyklus se mnohokrát opakuje a během krátké doby tak dochází k mnohonásobné amplifikaci vyšetřované sekvence DNA (88).

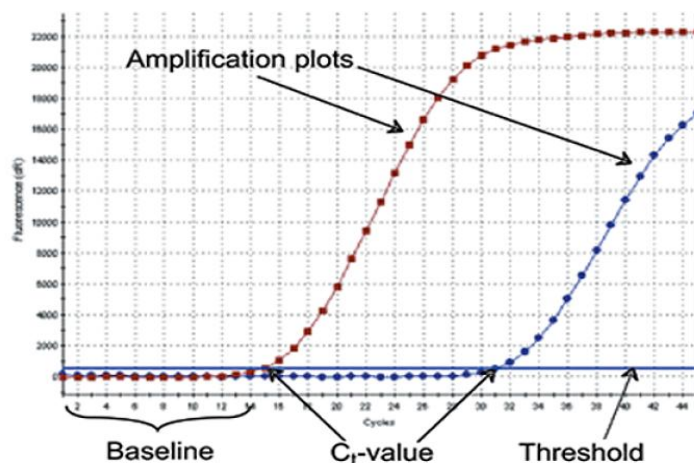
2.7.2.2.3 Kvantifikace počtu kopií DNA

Pro kvantifikaci počtu kopií DNA se využívá principu fluorescence, resp. nárůstu její intenzity během reakce. Základní požadavek je, aby když je DNA jednovláknová a neprobíhá polymerizace, byla minimální intenzita fluorescence, a aby došlo k jejímu nárůstu, jakmile polymerizace začne. Toho lze

docílit několika způsoby. Nutným požadavkem je označení sondy látkou s fluorescenční aktivitou (fluorofor) a přítomnost tzv. zhášedce (quencher), což je látka, která akceptuje energii fluoroforu a mění ji na fluorescenci jiné vlnové délky nebo na teplo. „Zhášení“ fluorescence lze tedy docílit několika způsoby dle použitého typu sondy. Důležitá je volba správného páru fluorofor – quencher. Nejčastěji jde o metodu, kdy fluorofor je připojen na 3'- a zhášedce na 5'-konec sondy (např. TaqMan® sonda, Molecular Beacons atd.). Excitovaný fluorofor předává svou energii zhášedci, který fluoreskuje, ale jedná se o fluorescenci jiné vlnové délky, než vydává fluorofor a její intenzita je nízká (tzv. FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer). Při vazbě sondy na komplementární sekvenci DNA se aktivuje Taq polymeráza, která začíná sondu štěpit od 5'-konce. Díky její 5'-3' exonukleázové aktivitě dochází k oddělení fluoroforu a zhášedce a intenzita fluorescence fluoroforu exponenciálně vzrůstá. Nárůst počtu produktů PCR je proto zpočátku exponenciální, ale jakmile je jedna z reagensí vyčerpána, dostává se do fáze plateau.

Počet produktů reakce je sledován nepřímo pomocí vzestupu intenzity fluorescence. Daná intenzita fluorescence odpovídá určitému počtu kopií DNA, jejichž nárůst tak lze sledovat v reálném čase. Podle času, kdy začne nárůst intenzity fluorescence, a dle křivky jejího vzestupu stanovujeme počáteční množství templátové DNA ve vzorku (Obr.6) (87) (89).

Obr. 6. Příklad stanovení real-time PCR s uvedením základních pojmů.



Baseline: první teplotní cykly, kdy není zjištěn žádný produkt reakce, protože fluorescenční signál je pod detekční mezí přístroje

Amplification plots: grafické znázornění akumulované fluorescence v každém vzorku. Kvantifikace probíhá v exponenciální fázi diagramu zesílení

Threshold: práh intenzity signálu, kdy překročí intenzitu fluorescence pozadí. Úroveň signálu je specifická pro přístroj i typ stanovení

Cycle to threshold (C_t): cyklus, při kterém byla intenzita fluorescence určena jako výrazně nad signálem pozadí. Je inverzně proporční k logaritmu počátečního počtu kopií. Hodnota C_t klinického vzorku je porovnávána s hodnotou C_t kalibru a kvantifikována.

(Převzato z uživatelské příručky Affigene® BKV trender (90))

Q-PCR reakce probíhá v real-time thermocycleru, který zajišťuje správné reakční podmínky a obsahuje detekční systémy fluorescence. Dle typu cycleru (resp. jeho detekčních kanálů pro jednotlivé vlnové délky fluorescence) obvykle vybíráme pár sonda-quencher. Většina přístrojů musí být před měřením spektrálně kalibrována. Kalibrační kity jsou obvykle dostupné s kity pro qPCR. Ke správnému vyhodnocení signálů ze cycleru je nutný příslušný software.

Pro každý cycler je definována **mez detekce** (LOD), a to jako nejnižší množství kopií DNA stanovené postupným ředěním, které dává pozitivní výsledek danou metodou PCR v 95% měření (experimentální LOD). Lze stanovit i teoretické LOD, které je založené na principu počítačového modelování a je stanoveno na základě spočítaného nejnižšího množství kopií DNA, které by daly v 95% PCR měření pozitivní výsledek (91).

LOD pro bezbuněčné vzorky se liší od LOD pro vzorky plné krve, protože lidská genomická DNA ovlivňuje citlivost stanovení, očekávají se různé hodnoty LOD u bezbuněčných matric, jako např. sérum nebo plasma, a u matric obsahujících buňky, jako je např. plná krev. U vzorků plasmy je pozadí pocházející od genomické DNA rovno nule, zatímco pozadí pocházející z plné krve od zdravých dárců představuje maximální pozadí, s přibližně $7,5 \times 10^6$ buněk/ml. U vzorků plné krve od imunodeficientních pacientů se očekává, že budou ovlivněny genomickým pozadím mezi těmito hodnotami v závislosti na počtu buněk a/nebo lymfocytů v každém vzorku pacienta. LOD bývá obvykle stanovena analýzou ředění BKV určitého sérotypu (např. I) a genotypu (např. genotyp Dun).

Pro každou q-RT PCR metodu by dále měl být charakterizován kvantitativní rozsah, inkluзивita, exkluzivita a kalibrace (kalibrační křivka).

Kvantitativní rozsah bývá stanoven analýzou ředění určitého BKV sérotypu (např. sérotypu I, genotypu Dun). Vzorek je paralelně ředěn BKV-negativním sérem, následně je extrahována a analyzována DNA BKV ze vzorku séra nebo plné krve.

Inkluzivita: inkluzivita je stanovována analýzou všech čtyř známých sérotypů BK viru pomocí dané metody a posouzení, zda jsou všechny sérotypy BKV detekovány se stejnou účinností, popř. který sérotyp je detekován s nižší účinností.

Exkluzivita: Exkluzivita je posuzována analýzou relevantních patogenů pro odhalení zkřížené reaktivity pro např.: SV40; JCV; HHV-6; HHV-7; HHV-8; VZV; HSV-1; HSV-2; HPV6b; Adenoviry; EBV; CMV; VZV; atd.

Kalibrační křivka se používá pro kvantifikaci DNA viru v klinických vzorcích. Hodnota Ct pro počet kalibračních přípravků se známými koncentracemi je vynesena do grafu proti odpovídající koncentraci. Počet kopií DNA viru v klinickém vzorku je určen z této křivky pomocí hodnoty Ct získané při stanovení. Kalibrátory s vysokým a nízkým obsahem DNA většinou vytvářejí kalibrační křivku (90).

Výsledkem vyšetření je stanovení BK virémie a virurie. Pokud je ve vyšetřovaném vzorku přítomno více než 10^4 kopií/ml plasmu nebo více než 10^7 kopií/ml moči, jedná se o vysokou intenzitu replikace BK viru. Dle Hariharana (77) je virémie nad 10^4 kopií/ml asociována se signifikantně vyšším rizikem nálezu BKNV v biopsii. Negativní prediktivní hodnota PCR vyšetření pro BKNV je 98%, pozitivní prediktivní hodnota pro BKNV je pro virémii 60% a pro virurii 30-40%. Maximální počet pacientů s nálezem pozitivní BK virémie bylo 23 týdnů po transplantaci ledviny (medián, rozsah 4-73 týdnů) (80).

2.7.2.2.4 Ovlivnění výsledku volbou specifického PCR protokolu

I přes správnost provedení se může výsledek lišit v závislosti na typu metody, který použijeme. Odlišnost v každém kroku může výsledek významně ovlivnit. Pozitivní kontroly mohou být např. plasmidy obsahující celý genom viru (referenční kmeny „Dunlop“ nebo „MM“) nebo vyrobené extrakcí z moči pacientů (tzv. MPS – mixed patients standard), které jsou dostupné komerčně a liší se tím, že např. MM kmen má delecii v regionu Large-T antigenu a některé sondy jej tak nemusí amplifikovat. Sondy a primery mohou být navrženy na detekci VP1, VP2, VP3, large T-antigenu, small T-antigenu, tzv. agnogeny (nebo také tzv. putative VPx) nebo replikačního počátku BK-viru. Při výběru sondy je také nutné zohlednit genotypy BKV, které ve vzorku předpokládáme. Vyhneme se tak oslabení vazby sondy a primerů z důvodů přítomnosti nukleotidových polymorfismů a falešně negativnímu výsledku. I přes odlišnosti jednotlivých metod by však rozdíl v počtu kopií/ml neměl pro

účely diagnostické a léčebné přesahovat 1 řád (92). Doposud nebyla navržena žádná standardizovaná metoda a jednotlivá centra používají sondy a primery, které si sami navrhli („home-made“ sondy) nebo komerčně dostupné kity.

2.7.2.3 Biopsie štěpu ledviny

Biopsie štěpu ledviny je zlatý standard v diagnostice BKN. Biopsické vzorky jsou zpracovány standardní parafinovou technikou, tkáňové řezy jsou pak barveny podle protokolu laboratoře IKEM (PAS, Giemsa, CAB, sirius red s elastikou, hematoxylin eosin, AFOG, PASM) (93). Histologický obraz BKN charakterizují cytopatické změny epitelů renálních tubulů a urotelu. Infikované buňky, v nichž probíhá replikace BKV mají zvětšené jádro s vezikulárními basofilními inkluzemi. Tento obraz je způsoben akumulací nově vznikajících virionů. Pro diferenciální diagnostiku polyomavírové a cytomegalovírové (CMV) infekce se používají imunohistochemické metody (94), v IKEM konkrétně imunoperoxidázová technika, kdy po deparafinaci je tkáň natrávena v mikrovlnné troubě v citrátovém pufru, pH 6,0. Po blokování endogenní peroxidázy (0,3% H₂O₂ v metanolu), endogenního biotinu a nespecifických vazeb je aplikována monoklonální protilátka proti SV40 large-T antigenu. Pro vizualizaci se používá 3,3diaminobenzidin (93). Vyšetření SV40 large-T antigenu není specifické pro BKV, neboť je zde zkřížená reaktivita mezi BKV, JCV a SV40. Pro odlišení jednotlivých polyomavirů je třeba použít species-specifické protilátky, hybridizaci in situ nebo PCR techniku.

Patologické změny při BKN zahrnují kůru i dřeň ledviny. Léze jsou multifokální a šíří se longitudinálně ve směru průběhu nefronu. Progrese BKN zahrnuje ztrátu renálních tubulů a vznik jizev v parenchymu na podkladě tubulo-intersticiální atrofie a fibrózy. Dle přítomnosti cytopatologických změn, intersticiálního zánětlivého infiltrátu, atrofie tubulárního epitelu a stupně fibrózy intersticia se popisují dle Drachenbergové jednotlivá stadia BKN (94):

Stádium A: v histologickém obraze jsou patrné pouze cytopatologické změny bez tubulární atrofie, fibrózy či přítomnosti zánětlivého infiltrátu.

Stádium B: zahrnuje kombinaci virových cytopatologických změn, fokální a/nebo multifokální tubulární atrofie, ohraničeného zánětlivého infiltrátu a intersticiální fibrózy.

Stádium C : (tzv. end-stage BKN) kdy v histologickém obraze dominuje difúzní jizvení intersticia, masivní fibróza, extenzivní tubulární atrofie s minimem vitálních tubulů a neohraničený zánětlivý infiltrát.

Zánětlivé změny asociované s BKVN jsou téměř nerozeznatelné od těch přítomných v histologickém obraze akutní celulární rejekce (ACR). V diferenciální diagnostice těchto dvou z hlediska terapeutických přístupů zcela rozdílných nálezů dle Hirsche et al. pro BKVN svědčí přítomnost cytopatologických změn způsobených BK virem, převažující polymorfonukleáry a plazmatické buňky v intersticiálním zánětlivém infiltrátu a imunohistochemický průkaz SV 40T antigenu. Přítomnost BKVN ovšem nevylučuje přítomnost ACR, protože BKVN může aktivací imunitního systému akutní rejekci vyvolat (80). Proto pokud je současně přítomná tubulitis, intimální nebo transmuralní arteritis, glomerulitis a lymfocytární zánětlivý infiltrát, je nutné uvažovat také o akutní celulární rejekci (80) (94). Dle poslední Banffské klasifikace však nelze odlišit histologický obraz ACR a BKVN, pokud je přítomen pouze intersticiální zánětlivý infiltrát. Jen pokud jsou zachyceny i cévní změny charakteristické pro ACR, lze říci, že jde o BKVN a ACR současně (95).

Klinické zkušenosti ukazují, že ani biopsie štěpu ledviny není 100% diagnostická metoda vzhledem fokální povaze lézí při BKVN. Byly totiž popsány případy persistující vysoce pozitivní BK virémie a progresivního zhoršování funkce štěpu i při opakovaně negativním nálezu v biopsii (96). Pro klinické hodnocení byly proto navrženy termíny: "possible BKVN" při opakovaně pozitivní BK-virurii, "presumptive BKVN" při persistující pozitivní virémii a „definitive BKVN" při biopsickém průkazu BKVN (97).

2.7.2.4 Méně rozšířené a experimentální diagnostické metody replikace BK-viru

Ke vzácněji používaným non-invazivním diagnostickým metodám BKVN patří kvantifikace m-RNA VP-1 proteinu z moči (resp. z uroteliálních buněk z moči izolovaných) pomocí kvantitativní real-time PCR. Při množství VP-1 mRNA/ng celkové RNA buněk ze vzorku $>6,5 \times 10^5$ byla senzitivita tohoto vyšetření pro BKVN 94-100% a specifita 94-97% (98) (99). Recentní výzkum jde cestou identifikace prognostických biomarkerů z moči, konkrétně např. stanovení množství granzym-B m-RNA a inhibitoru proteinázy-9 m-RNA (markery apoptózy), kdy signifikantně vyšší množství bylo prokázáno v močových buňkách pacientů s významným vzestupem sérového kreatininu (99).

2.7.3 Terapie BKVN

2.7.3.1 Úprava imunosupresivní terapie

Úhelným kamenem léčby BKVN je redukce imunosupresivní terapie. Z mnoha kombinací (tab. 1) snižování dávek, záměny či vysazení jednotlivých preparátů se jako nejúčinnější postup ukazuje změna tacrolimu na CyA nebo snížení dávky tacrolimu tak, aby sérová hladina byla méně než 6ng/ml a vysazení mykofenolát mofetilu (80).

Tab. 1
Léčba BKVN modifikací imunosupresivní
terapie

Výměna		Snížení dávky		Vysazení dosavadní IS a přechod na duální terapii:
tacrolimus	→	CyA (hladiny 100-150 ng/ml)	tacrolimus (hladina ≤ 6ng/ml)	CyA/prednison
MMF	→	azathioprin (dávka ≤ 100mg/d)	MMF (dávka ≤ 1g/d)	tacrolimus/prednison
tacrolimus	→	sirolimus (hladina ≤ 6ng/ml)	CyA (hladina ≤ 100-150ng/ml)	sirolimus prednison
MMF	→	sirolimus (hladina ≤ 6ng/ml)		MMF/prednison
MMF	→	leflunomid		

Upraveno dle Hirsche et al (80).

Doporučení vysadit tacrolimus vyplývá i ze závěrů studií rizikových faktorů vzniku BKVN, kde léčba tacrolimem byla spojena se signifikantně vyšším rizikem persistující BKV replikace (82) (83). Dle výsledků Brennan et al. je naopak léčba CyA/MMF spojena s nejnižší incidencí BK virémie (4%) ve srovnání s kombinacemi tacrolimus/azathioprin (12%) nebo tacrolimus/MMF (13%) (81). Ve studii in vitro autoři prokázali, že CyA potlačuje replikaci BKV v kultuře uroepiteliálních buněk mechanismem inhibice BKV-LargeT antigenem aktivovaného promotoru (100).

Závěry vyplývající z analýzy klinických studií podporuje i další studie in vitro, ve které bylo prokázáno, že aktivita BKV specifické T-buněčné imunity závisí na koncentraci kalcineurinových inhibitorů (CNI) v médiu. Snížení dávky CNI by tedy mělo být prvním krokem v terapii BKVN. Alternativou nebo druhým krokem by pak mohla být výměna CNI za m-TOR inhibitor (101). Pro tento postup svědčí také studie klinická, kde autoři porovnávali imunosupresivní režimy (dávka nebo hladina léčiva) u pacientů s biopticky prokázanou BKVN proti negativním kontrolám a prokázali, že riziko BKVN koreluje s hladinou tacrolimu a dávkou prednisonu. Naopak podávání MMF nebylo spojeno se signifikantně vyšším rizikem vzniku BKVN. Snížení dávky či vysazení tacrolimu a redukce či vysazení prednisonu při ponechání MMF by tak mohlo být alternativou léčby BKVN (102).

Doporučení vysadit kortikoidy podporují i závěry studie Moens et al., který prokázal, že přidáním dexametazonu, progesteronu a 1713-estradiolu do kultivačního média se zvýšila tvorba nových virionů až 11x (pro dexametazon), 5x u progesteronu a 3x u estradiolu (12).

Při současné přítomnosti ACR a BKVN je doporučováno nejprve zahájit antirejekční terapii a po ústupu histologického obrazu ACR redukovat imunosupresivní terapii (80), i když výsledky novějších studií nutí k přehodnocení tohoto doporučení, neboť u pacientů s histologickými známkami ACR a současně vysokou hodnotou BK-virurie byla pozorována špatná odpověď na antirejekční léčbu (pouze u 27% pacientů došlo k poklesu sérového kreatininu a u 39% k ústupu histologického obrazu rejekce hodnoceného dle Banffské klasifikace). Naopak u těchto pacientů došlo k signifikantnímu nárůstu BK-virurie po antirejekční léčbě (103). Tyto výsledky podporují závěr, že intersticiální zánětlivý infiltrát patřil ve výše popsáných případech spíše do obrazu BKVN než že by byl známkou současné přítomnosti ACR.

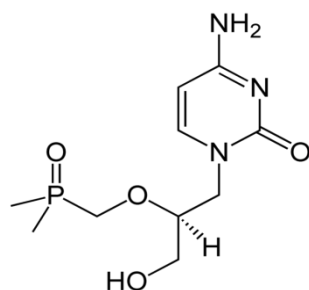
2.7.3.2 Antivirotika a látky s antipolyomavirovou aktivitou

Kromě úpravy imunosupresivní terapie byly testovány i antivirové preparáty, které účinně inhibovaly replikaci BKV ve studiích in vitro. Do širšího klinického použití se dostaly cidofovir (104) a leflunomid (105). Hodnoceno bylo i podávání imunoglobulinů (IVIG) (106) nebo chinolonů (107).

2.7.3.2.1 Cidofovir

Cidofovir je nukleotidový analog deoxycytidinu (dCTP monofosfát). Chemicky jde o 1-[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine dihydrát (obr.7).

Obr. 7. Strukturní vzorec cidofoviru



Cidofovir se po intravenózním podání metabolizuje na aktivní intracelulární metabolit – cidofovir difosfát. Mechanismem účinku je kompetitivní, selektivní inhibice inkorporace dCTP do virové DNA pomocí virové DNA polymerázy.

Cidofovir difosfát inhibuje virovou DNA polymerázu při 8-600x nižší koncentraci než je koncentrace, při které dochází k inhibici DNA polymeráz alfa, beta a gama v lidských buňkách.

Inkorporací cidofoviru dojde přerušení elongace řetězce DNA (tzv. delayed chain terminator). Cidofovir není (na rozdíl od např. acykloviru) fosforilován (a tudíž aktivován) virovými kinázami. Je tak podstatně menší riziko vzniku rezistence na cidofovir mechanismem mutací virové DNA polymerázy (108).

Cidofovir je registrován pro léčbu CMV retinitidy u pacientů s AIDS a podává se v dávce 5mg/kg. Pro vysoké riziko nefrotoxicity je nutné jej v této dávce podávat za dostatečné hydratace a s probenecidem. Mechanismus nefrotoxicity je dán aktivní tubulární sekrecí cidofoviru, což způsobuje jeho akumulaci v buňkách proximálních tubulů ledvin. O několik řádů vyšší koncentrace cidofoviru následně indukuje jejich apoptózu (109). Probenecid chrání buňky tubulárního epitelu inhibicí tubulární sekrece cidofoviru (110). Klinicky se postižení ledvin projevuje jako nárůst proteinurie a/nebo vzestup hodnot sérového kreatininu s progresí až do obrazu akutního renálního selhání.

Cidofovir patří dle některých in vitro studií k nejselektivnějším antipolyomavirovým preparátům (104), i když mechanismus antivirového působení není zcela jasný, protože polyomaviry nekódují vlastní DNA polymerázu. Dle recentních studií je antipolyomavirový efekt cidofoviru zprostředkován inhibicí replikace BKV DNA a snížením exprese genů následujících expresi large-T antigenu. Tato inhibice však byla provázena významným toxickým efektem na lidské tubulární buňky použité ve studii (111).

K terapii BKVN byl cidofovir podáván v cca. 10x nižší dávce, než je indikováno pro léčbu CMV retinitis, a to konkrétně 0,25-0,5mg/kg každé 2 týdny za dostatečné hydratace bez probenecidu. U všech pacientů byla současně snižována nebo jinak upravována imunosupresivní terapie dle doporučení panelu expertů (80).

Vysoké dávky cidofoviru mohou naopak zhoršit renální funkce, jak ukazuje např. studie Pallet al., kde cidofovir v dávce 16mg/kg podávaný současně s redukcí IS terapie nesnížil signifikantně replikaci BKV ani neredukoval fibrózní změny ve štěpu (IF/TA skóre). Naopak u pacientů, kterým byl cidofovir v těchto vysokých dávkách podáván, byl prokázán rychlejší a častější pokles renálních funkcí ve srovnání s kontrolní skupinou, ve které byla pouze redukována IS terapie (112).

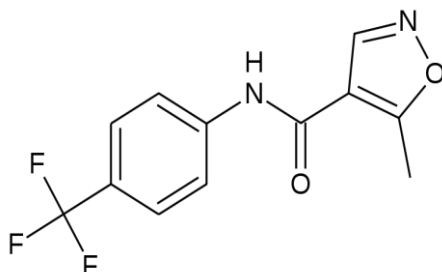
Dle Hilton et al., která zhodnotila výsledky 26 studií týkajících se terapie BKVN cidofovirem, došlo u 49% pacientů k poklesu BK virémie a naopak u 23% došlo i přes terapii k progresi renální insuficience a k selhání štěpu (113).

2.7.3.2.2 Leflunomid

Leflunomid je inhibitor de-novo syntézy pyrimidinů (cestou inhibice enzymu dihydroorotát dehydrogenázy). Zasahuje tedy do mnoha mechanismů na buněčné úrovni, mezi něž patří např. inhibice proliferace aktivovaných T-lymfocytů, inhibice aktivovaných monocytů/makrofágů, inhibice aktivovaných B-lymfocytů, potlačuje diferenciaci osteoklastů, tlumí endotoxinem indukovanou destrukci kostí (114). Jeho široké spektrum účinku je dáno schopností blokovat buněčný cyklus ve fázi G1 inhibicí aktivity tyrosin kináz, které jsou součástí signálních kaskád T a B lymfocytů, hladkých svalů cév a fibroblastů (105).

Chemicky jde o 5-methyl-N-[4-(trifluoromethyl) phenyl]-isoxazole-4-carboxamide (obr.8).

Obr.8. Strukturní vzorec leflunomidu



Leflunomid je registrován k léčbě psoriatické a revmatoidní artritidy jako tzv. DMARD (disease-modifying antirheumatic drug). Samotný leflunomid je proléčivo a jeho konverze na aktivní metabolit A77 1726 je realizována převážně neenzymaticky ve střevě a v plazmě.

Metabolit A77 1726 má imunosupresivní a imunomodulační účinky, neboť bloádou dihydroorotát dehydrogenázy inhibuje proliferaci lymfocytů. In vitro vykazuje anti-CMV a antipolyomavirovou aktivitu. Možným vysvětlením anti-CMV efektu je interference leflunomidu s mechanismem novotvorby virionu (konkrétně interakce nově syntetizované virové DNA a kapsidových proteinů (assembly) a vznikem glykoproteinové výplně mezi kapsidou a obálkou virionu (tegumentace) (113). Mechanismus antipolyomavirové aktivity objasňují až recentní studie, které ukazují, že leflunomid

inhibuje replikaci genomu BKV, expresi proteinů, „assembly“ virionů a jejich uvolňování z buňky. Na strukturální úrovni jde o porušení architektury jádra během replikace BKV DNA jako výsledek nespecifické deplece pyrimidinů. Významný antipolyomavirový efekt byl dosažen při koncentraci aktivního metabolitu A77 1726 10 microg/ml, kdy došlo k redukci počtu nově vytvořených virionů o 90% (IC 90), ale za cenu výrazného cytostatického působení na tubulární buňky (115).

V léčbě revmatoidní a psoriatické artritidy je běžné dávkování leflunomidu první 3 dny 100 mg, dále pak 20 mg denně, u pacientů neodpovídajících na léčbu bývá účinná eskalace dávky na 40 mg denně. Leflunomid bývá často podáván v kombinaci jinými látkami, které jsou indikované k léčbě revmatických onemocnění (methotrexát, sulfasalazin, nesteroidní antirevmatika, kortikoidy, biologická léčba atd.) (116).

V terapii BKVN byl leflunomid podáván v dávce 100mg/den první 3 dny, dále pak 20-60mg/den, aby bylo dosaženo sérových hladin aktivního metabolitu A77 1726 50-100 ng/ml (105). Dle analýzy, kterou publikovala Hilton et al. bylo nejčastější dávkování v rozmezí 20–40 mg/den. U 49% pacientů, kterým byl podáván leflunomid, došlo k poklesu BK virémie a naopak u 17% došlo i přes terapii k progresi renální insuficience a k selhání štěpu (113). Podávání vyšších dávek leflunomidu bylo spojeno s vysokým rizikem hemolýzy (117).

2.7.3.2.3 Fluorochinolony

Fluorochinolony inhibují replikaci bakteriální DNA interakcí s bakteriálními enzymy gyráza a topoisomerasa IV. Inhibice gyrázové aktivity zahrnuje i interakci s helikázovou komponentou bakteriální gyrázy. Tento mechanismus se zdá být důležitý v antipolyomavirové aktivitě chinolonů, neboť helikázová aktivita T-antigenu je klíčová pro replikaci BKV. V in vitro studiích byla skutečně prokázána antipolyomavirová aktivita chinolonů oproti ostatním antibiotikům (118). V další studii bylo prokázáno, že fluorochinolony inhibují tvorbu plaku SV 40 mechanismem inhibice helikázové aktivity SV40 T-antigenu (107).

V klinické studii pak bylo prokázáno snížení BK virurie u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk léčených ciprofloxacinem ve srovnání s těmi léčenými cefalosporiny (119). O použití chinolonů k terapii BKVN jsou však data velmi omezená. Ciprofloxacin byl obvykle podáván v dávce 500mg/den. Dle (113) byl v celkem 2 klinických hodnoceních (120) (121) popsán průběh BKV infekce za současného podávání chinolonů u 14 pacientů, kde ani u jednoho nedošlo k poklesu replikace BK viru nebo k selhání štěpu na podkladě BKVN.

2.7.3.2.4 Intravenozní imunoglobuliny (IVIg)

IVIg byly v terapii BKVN použity pro své imunomodulační a i potenciálně antipolyomavirové účinky protože dle (106) bylo prokázáno, že obsahují i anti-BKV protilátky. IVIg byly nejčastěji podávány v množství 1-2g/kg v jedné až dvou dávkách nebo 150mg/kg 2x týdně podobu 8 týdnů (79) a to samostatně pouze za snížení imunosupresivní terapie nebo v kombinaci s cidofovirem (122) nebo s leflunomidem (123). Dle analýzy Hilton et al. (113), která provedla hodnocení 5 klinických studií o celkovém počtu 29 pacientů došlo po podání IVIg u 52% pacientů k poklesu BK virémie a u 7% i přes terapii k selhání funkce štěpu.

2.7.3.3 Porovnání účinnosti terapeutických přístupů

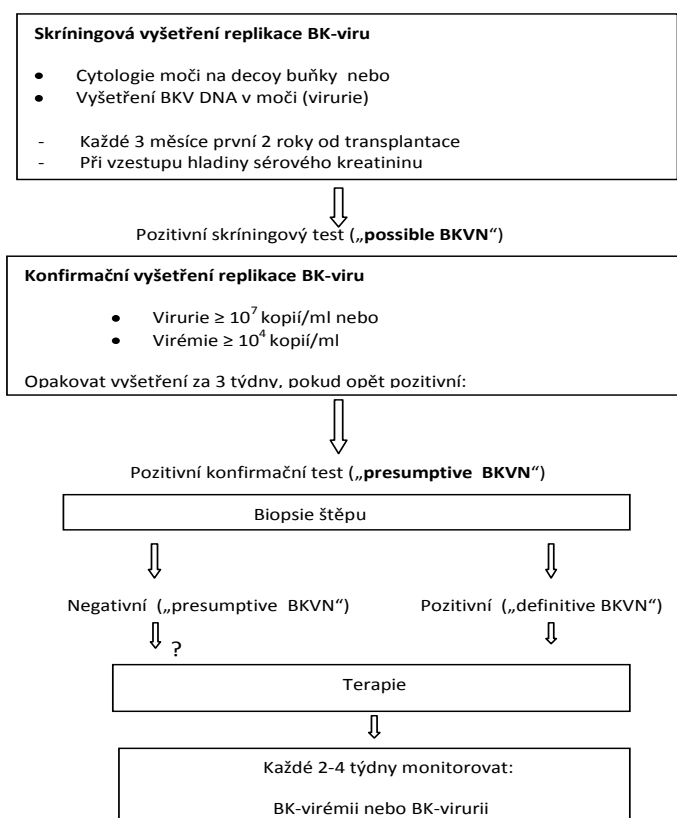
Při porovnání účinnosti jednotlivých terapeutických přístupů lze říci, že vliv cidofoviru, leflunomidu a IVIg na pokles BKV replikace je zhruba stejný (49%, 49% a 52%). Riziko ztráty funkce štěpu se zdá být nižší u terapie IVIg ve srovnání s cidofovirem a leflunomidem (7% versus 23% a 17%), ale vzhledem k nízkému počtu zařazených pacientů je takovéto statistické srovnání velmi pochybné (113). Recentní práce založená na metaanalýze výsledků studií podávání cidofoviru a leflunomidu pak potvrzuje, že léčba cidofovirem nebo leflunomidem při současné redukci dávek imunosupresivní terapie nevede ve srovnání se samotnou redukcí dávek imunosuprese k signifikantně nižším ztrátám funkce štěpu na podkladě BKVN (124).

I přes léčbu však u 30-60% jedinců s biopticky prokázanou BKVN dojde k selhání funkce štěpu (77), zvláště pokud je současně s pozitivním bioptickým nálezem již přítomna i dysfunkce štěpu (79). Vzhledem k poznatku, že u většiny pacientů virurie (a pozitivita decoy buněk) o 4 týdny (medián) předcházela BK virémií a o 12 týdnů BKVN (80), byly provedeny studie, kdy imunosuprese byla redukována již v okamžiku průkazu persistující BK virémie (tj., „presumptive“ BKVN) před rozvojem renálního postižení – tzv. **preemptivní redukce imunosuprese**. Výsledky tohoto postupu jsou podstatně povzbudivější než v případě terapeutického zásahu až v okamžiku rozvoje BKVN, protože na rozdíl od výsledků Hariharana et al. (77) došlo téměř u všech pacientů s "presumptive BKVN" po redukci dávek imunosupresivní terapie k poklesu BK virémie bez rozvoje BKVN (81) (96) (125).

2.7.4 Skrining replikační aktivity BK-viru jako diagnostická metoda „presumptive BKN“

Léčba BKN infekce již v okamžiku vzestupu BK virémie nebo virurie si vyžádala zavedení pravidelného skriningu rizikových pacientů do klinické praxe. Byly navrženy v podstatě dva přístupy: jednak dle Hirsche et al. (80), který doporučuje monitorovat virurii (popřípadě přítomnost decoy buněk) každé 3 měsíce první dva roky po transplantaci anebo vždy při zhoršení funkce štěpu. Při pozitivě skriningu (přítomné decoy buňky a/nebo virurie $\geq 10^7$ kopií/ml) je doporučeno jej zopakovat během 4 týdnů a provést vyšetření BK virémie. Pokud je pozitivní i BK-virémie ($\geq 10^4$ kopií/ml) mělo by se vyšetření zopakovat za 3 týdny. Persistence positivity BK-virémie déle než 3 týdny splňuje kritéria „presumptive BKN“ a je doporučeno provedení biopsie (obr. 9). Preemptivní redukce imunosuprese není ještě do tohoto schématu zapojena (v tomto kroku je zatím otazník), nicméně výsledky recentních studií ukazují na její oprávněnost, i když je vždy nutné každého pacienta posuzovat individuálně hlavně z hlediska rizika rozvoje akutní rejekce.

Obr. 9. Schéma monitoringu replikace BK-viru

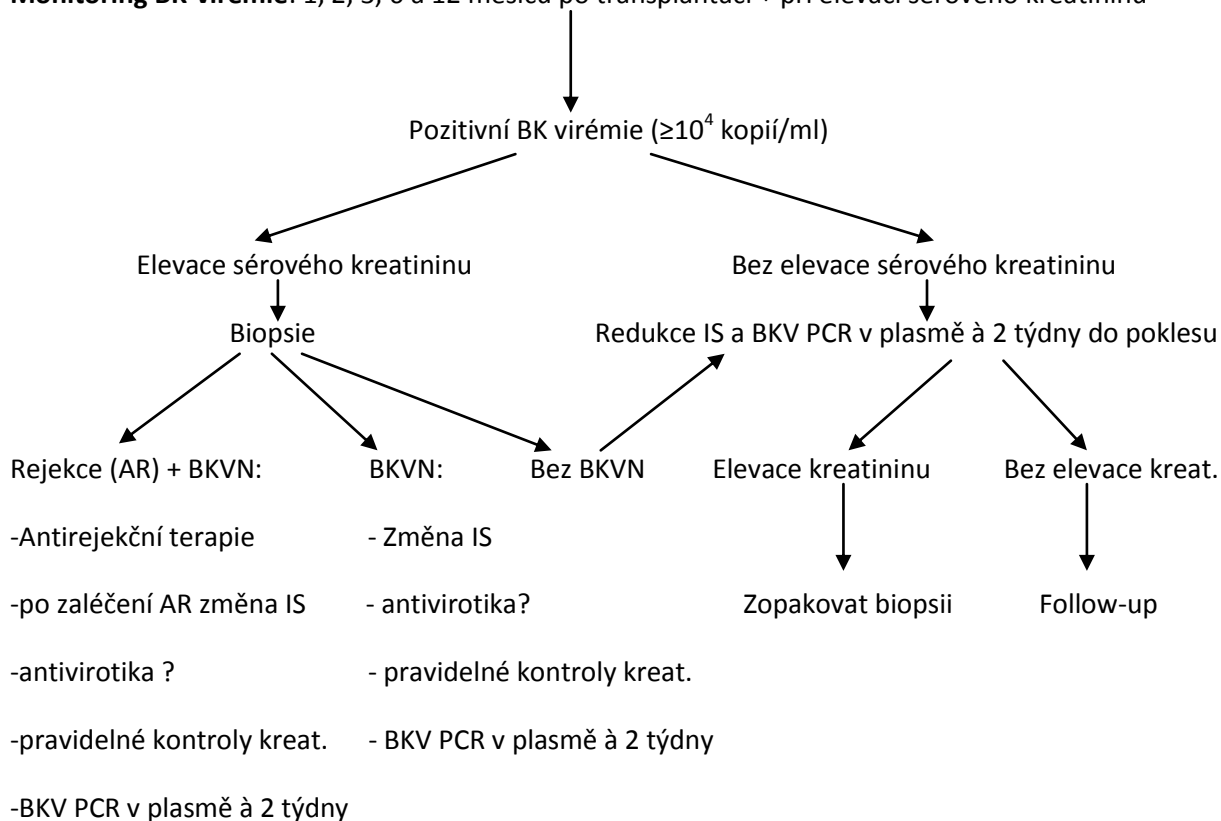


Upraveno dle Hirsche et al. (80)

Druhé schéma skriningových vyšetření je postaveno na monitoringu BK virémie (126)(Obr.10), protože vyšetření virémie má vyšší pozitivní prediktivní hodnotu pro BKVN (60%), zatímco samotná virurie pouhých 30-40% (79) (80). Zůstává zatím nezodpovězeno, zda provádět skrining pouze 12 nebo 24 měsíců od transplantace, jak navrhuje Hirsch, neboť většina biopsicky potvrzených nálezů BKVN sice byla v prvním roce po transplantaci (78), ale více než čtvrtina případů se rozvine později (76) (77).

Obr. 10. Algoritmus skriningu BK-virémie a doporučených vyšetření

Monitoring BK-virémie: 1, 2, 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci + při elevaci sérového kreatininu



Upraveno dle Randhawa P., Brennan DC. (126)

Svou váhu v tomto rozhodování má i hledisko ekonomické. Ekonomická analýza v jednom transplantačním centru v Kanadě nejprve prokázala, že rutinní provádění skriningu BKV metodou PCR je efektivní až pokud incidence BKVN v daném centru překročí 2,1% (127). Další studie ze stejného centra však ukazuje, že při preemptivní redukci imunosuprese u pacientů s presumptivní BKVN už na konci 2. roku od zavedení skriningu bylo 61% nákladů na skrining pokryto ze zdrojů ušetřených při

redukci imunosuprese a po 30 měsících dokonce úspory z redukce imunosupresivní terapie převyšovaly náklady. Jako skrínigové vyšetření byla v tomto případě zvolena cytologie moči (decoy buňky) 3, 6, 9, 12, 18 a 24 měsíců po transplantaci. Při pozitivním nálezu bylo provedeno vyšetření BK virémie. Pokud virémie přesahovala 7700 kopií/mL, byla postupně redukována imunosupresivní terapie (128).

2.7.5 Re-transplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN

Re-transplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN je metodou volby (129). Riziko rekurence BKVN v novém štěpu se pohybuje kolem 15%, což ukazuje, že incidence BKVN u retransplantovaných je vyšší ve srovnání s prvním štěpem. Je proto doporučováno, aby retransplantace neprobíhala v průběhu aktivní BKV replikace (80), i když někteří autoři popsali jednotlivé případy, kdy u pacientů re-transplantovaných při vysoké pozitivitě BK virémie nebyla ani v dlouhodobém sledování prokázána rekurence BKVN (130).

Redukce virémie lze docílit několika způsoby: redukcí imunosupresivní terapie (eventuelně v kombinaci s podáváním antivirových preparátů) nebo odstraněním štěpu ledviny před retransplantací. Preemptivní odstranění selhaného štěpu se ukazuje být nejefektivnější metodou redukce virémie, neboť clearance BK viru je velmi rychlá ($t_{1/2}$ BKV v plasmě 1-2h). Bylo spočítáno, že k udržení virémie 10^4 kopií/ml po dobu 24 hod. se za tuto dobu musí rozpadnout až 10^6 tubulárních buněk. U pacientů s redukcí imunosuprese byl pokles virémie ($t_{1/2}$ clearance BKV) 6h-17dní, zatímco po nefrektomii bylo $t_{1/2}$ BKV 20-38 hod. (131). Nevýhodou preemptivní nefrektomie je nutnost podstoupit další chirurgický výkon a dialýza před re-transplantací. Argument pro transplantaci i přes aktivní virémii byl právě benefit preemptivní re-transplantace (před zahájením dialýzy), neboť dlouhodobá funkce štěpu je lepší u pacientů preemptivně transplantovaných ve srovnání s těmi, kteří již byli dialyzováni (132).

2.8 BKVN po transplantaci ledviny a pankreatu

Incidence, prevalence a průběh BKV infekce u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) jsou daleko méně prostudované než je tomu u příjemců ledviny samotné. Incidence pozitivní replikace BKV (virémie a virurie) u SPK příjemců byla 26-28% (133) (134), zatímco incidence BKVN se u této skupiny pacientů pohybuje v rozmezí 2.9-15% (133) (135) (136). I přes podezření, že diabetes mellitus je jedním z rizikových faktorů rozvoje BKVN, je v recentních studiích popisována spíše nižší incidence BKVN u SPK příjemců (5.6%) (137). Rozvoj BKVN u SPK příjemců se také zdá být pozdější (medián 18 měsíců, rozsah 12-20 měsíců) (133) (135) (136) (137) ve srovnání s příjemci

samotné ledviny, kdy většina biopticky potvrzených nálezů BKVN byla v prvním roce po transplantaci (median 318 dní, rozsah 48-1356 dní) (78).

U SPK příjemců je oproti pacientům po transplantaci samotné ledviny několik odlišností, které je nutné brát v úvahu:

1. i přes doporučení recentních studií redukovat imunosupresivní terapii v okamžiku persistující virémie musíme brát ohled na funkční pankreas a riziko akutní rejekce štěpu pankreatu po redukci imunosuprese.
2. SPK příjemcům je častěji podávána imunosupresivní indukce (ATG, monoklonální protilátky), což je nutné vzít do úvahy při hodnocení rizikových faktorů BKV replikace.
3. V dlouhodobé imunosupresivní terapii se u SPK pacientů snažíme vyhnout podávání kortikoidů vzhledem k jejich diabetogennímu účinku. Dlouhodobé podávání kortikoidů je velmi pravděpodobně jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů rozvoje BKVN.
4. Skríníng replikace BKV založený na detekci decoy buněk může být problematický u pacientů s drenáží exokrinního vývodu pankreatu na močový měchýř (138).
5. Vzhledem k pozdějšímu rozvoji BKVN u SPK příjemců by mělo být zváženo prodloužení skríníngu minimálně na 24 měsíců.

3 Cíle dizertační práce

Cílem mé práce bylo:

1. Zavedení vyšetřovací metody BK-virémie v IKEM pro klinické použití a verifikace přesnosti této metody porovnáním výsledků laboratoře IKEM s výsledky vyšetření provedených laboratoří prof. Hirsche (Div. Molecular Diagnostics, Clinical & Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology, Basel, Switzerland).
2. Stanovení prevalence a incidence BK-virémie a BKVN v populaci diabetických příjemců po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) a testování rizikových faktorů replikace BK-viru v této populační skupině.
3. Posouzení, zda re-transplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKVN je u SPK příjemců vhodným terapeutickým přístupem z hlediska možného vlivu na funkci štěpu pankreatu a zhodnocení rizika rekurence BKVN u těchto pacientů

Jako studentka postgraduálního doktorského studia biomedicíny jsem také pracovala v laboratoři Langerhansových ostrůvků (laboratoř LLO PEM IKEM) zabývající se transplantacemi LLO v experimentu i v klinické praxi a na Klinice diabetologie Centra diabetologie IKEM. Tato pracoviště se systematicky zabývají transplantační léčbou a komplexní péčí o diabetické příjemce. Pod odborným vedením prof. Saudka a MUDr. Boučka jsem vypracovala metodiku klinického sledování pacientů v riziku BKVN i s již prokázanou BKV infekcí, sledovala jsem jejich laboratorní parametry a klinický stav.

V neposlední řadě jsem sama pod vedením RNDr. Jarešové (Pracoviště klinické a transplantační imunologie IKEM) provedla analýzu jejich vzorků pomocí metody kvantitativní real-time PCR na přítomnost BKV DNA v séru a vyhodnocení výsledků. Výsledky takto získané jsem porovnávala s výsledky, jejichž analýzu nám laskavě provedla laboratoř Transplantační virologie, Basilej.

4 Studie 1

Porovnání real-time PCR metody zavedené v IKEM (Affigene® BKV trender) s PCR protokolem prováděným v laboratoři Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej

4.1 *Úvod a hypotéza*

Výsledky jednotlivých kvantitativních real-time PCR metod se mohou podstatně lišit. Tato variabilita je dána použitím různých kombinací sond a primerů, volbou referenčního materiálu (pozitivní kontrola) a také detekovaným subtypem BKV. Vzhledem k rozdílům mezi jednotlivými subtypy je vhodné volit sekvenci primerů a sondy z oblasti evolučně nejvíce konzervované oblasti BKV genomu. Měření počtu kopií DNA závisí na amplifikační účinnosti primerů, dále pak na efektivitě annealingu a enzymatického štěpení sondy a rovněž na relativní amplifikační účinnosti cílového versus referenčního materiálu. Doposud nebyla navržena žádná standardní metoda závazná pro laboratorní klinickou praxi. Pokud chceme výsledky používat při rozhodování o léčebném postupu, neměly by se výsledky jednotlivých metod v klinicky relevantním rozmezí lišit o více než $1.0\log_{10}$ (92). Vzhledem k tomuto požadavku jsme porovnávali výsledky BK-virémie získané analýzou dle Affigene® BKV PCR protokolu zavedeným v IKEM pro rutinní diagnostiku BKV infekce s výsledky BK-virémie vyšetřeny dle PCR protokolu virologického centra v Basileji, který byl tímto centrem vyvinut a jehož výsledky sehrály hlavní úlohu při stanovování terapeuticky relevantních referenčních hodnot BK-virémie a BK-virurie. Při signifikantní korelaci výsledků vyšetření jednoho biologického vzorku oběma metodami tak bude potvrzena spolehlivost metody vyšetření BK-virémie v našem centru.

4.2 *Metodika*

Vzorky plasmy a séra odebrané ve stejnou dobu pacientům po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu byly vyšetřeny pomocí metody kvantitativní real time (q-RT) PCR na přítomnost BKV DNA v laboratoři IKEM a v laboratoři Transplantační virologie, Basilej (Div. Molecular Diagnostics, Clinical & Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology, Basel, Switzerland). Při počtu kopií

BKV DNA/ml < 10^3 byl vzorek posuzován jako negativní, 10^3 - 10^4 kopií/ml jako hraniční a > 10^4 kopií/ml jako pozitivní (80). Po provedení PCR analýzy metodou Affigene a po obdržení výsledků z laboratoře v Basileji jsem porovnála výsledky celkem 100 měření. Pacienti s nenulovými hodnotami BK-virémie byli vyšetřováni opakovaně.

4.2.1 Vyšetření BK-virémie v IKEM (affigene® BKV trender PCR protokol)

Po odebrání cca. 8ml krve do zkumavky na separaci séra (konkrétně Becton-Dickinson SST®/SST II® Plastové zkumavky Vacutainer) byl vzorek centrifugován (1500g, 20min) a zamražen na -20°C. Po nashromáždění dostatečného množství vzorků k otevření analytické soupravy jsem provedla stanovení BK-virémie.

4.2.1.1 Extrakce DNA ze vzorku

DNA byla extrahována z 200 µl séra dle uživatelské příručky Affigene® BKV trender.

Souprava affigene® DNA extraction obsahuje: Lysis buffer 1, Lysis buffer 2, Proteinázu K, pufr Proteinázy K, vymývací roztoky Wash 1 a Wash 2, Eluent, Spin columns (vazebné kolonky) a (sběrové zkumavky) collection tubes. Před započítím samotné extrakce DNA bylo nutné nejprve připravit reagentie.

4.2.1.1.1 Krok I: příprava reagentií

1. Příprava pracovního lytického pufru byla provedena převedením Lysis buffer 1 do Lysis buffer 2 a důkladným promícháním.
2. Poté následovala příprava Wash-2 přidáním 28ml etanolu do každé lahvičky s důkladným promícháním
3. Příprava roztoku lyofilizované proteinázy K přidáním 1,35 ml Proteinase K buffer (pufru proteinázy K)

4.2.1.1.2 Krok II: Lyze bezbuněčných vzorků

1. Na vortexu byla zamíchána kontrola DNA bez templátu (DNA IC carrier – vnitřní kontrola) a přidána 200 µl do 1,5ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem. (vnitřní kontrola a kontrola bez templátu (NTC-negativní kontrola) jsou součástí všech souprav affigene® trender)
2. Na vortexu byly zamíchány klinické vzorky a přidány 200 µl do 1,5ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem.

3. Do všech vzorků bylo přidáno 25 μ l roztoku proteinázy K
4. Dále bylo do všech vzorků přidáno 200 μ l pracovního lytického pufru s vnitřní kontrolou a směs byla důkladně promíchána na vortexu (10-20s).
5. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě (+20 až +25 °C) po dobu 15 minut.
6. Směs byla důkladně promíchána na vortexu (10 - 20s).
7. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 70 °C.

4.2.1.1.3 Krok III: Vazba na kolonku a vymytí DNA

1. Do každého vzorku bylo přidáno 210 μ l ethanolu (96 - 100%) a byl následně promíchán na vortexu.
2. Pro každou separaci byla vložena jedna Spin column do Collection tube a do ní byla nanesen vzorek.
3. Poté byla provedena centrifugace 1 minutu při 11 000 \times g.
Neprošly-li vzorky skrz matici úplně, centrifugaci byla opakována při vyšší odstředivé síle g (< 15 000 \times g).
4. Collection tube s protečeným roztokem byla zlikvidována.
5. Spin column byla vložena do nové Collection tube a následně bylo přidáno 500 μ l Wash-1.
6. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 11 000 \times g.
7. Collection tube s protečeným roztokem byla zlikvidována.
8. Spin column byla vložena do nové Collection tube a bylo přidáno 600 μ l Wash-2.
9. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 11 000 \times g.
10. Collection tube s protečeným roztokem byla zlikvidována.
11. Znovu byla vložena Spin column do nové Collection tube a bylo přidáno 600 μ l Wash-2.
12. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 11 000 \times g.
13. Collection tube s protečeným roztokem byla zlikvidována.
14. Spin column byla znovu vložena do nové Collection tube a centrifugována 2 minuty při 11 000 \times g, aby vyschla silikagelová membrána.

4.2.1.1.4 Krok IV: Eluce DNA do 60 μ l

1. Do mikrocentrifugační zkušavky o objemu 1,5 ml byla vložena Spin column a přímo na silikagelovou membránu přidáno 60 μ l předem ohřátého Eluent (70 °C).
2. Vzorek byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě.
3. A následně centrifugován 1 minutu při 11 000 \times g.

4. Spin column byla zlikvidována a eluovaná DNA uložena. Připravené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C do provedení analýzy.

4.2.1.2 Provedení kvantitativní real-time PCR

Bezprostředně před použitím byly všechny reagenty i vzorky zcela rozmrazeny (přibližně 20 minut při pokojové teplotě) a promíchány na vortexu.

Součástí analytické soupravy je kontrolní sada a detekční sada. Kontrolní sada obsahuje pozitivní kontrolu (DNA IC Carrier, tj. pufrální roztok obsahující neinfekční syntetickou DNA s IC sekvencemi a poly(A)-RNA) (vnitřní kontrola), která byla použita již při extrakci DNA, dále negativní kontrolu (DNA NTC) a 2 kalibrátory (BKV tender High, BKV tender Low). Součástí detekční sady jsou BKV tender Master mix (MMx) - tj. tlumicí roztok obsahující nukleotidy, primery/sondu, UDG a DNA polymerázu (Taq-polymeráza), roztok MgCl₂ (Mg16) a směšovací zkumavku pro přípravu pracovní matice.

4.2.1.2.1 Krok I: Příprava pracovní matice

1. Zkumavky s BKV tender MMx a Mg 16 byly krátce centrifugovány.
2. BKV tender MMx a Mg 16 byly odpipetovány do dodané směšovací zkumavky podle tabulky 2.
3. Směs byla promíchána na vortexu, následně krátce zcentrifugována.

Tab. 2. Tabulka uvádí množství každého činidla potřebného pro různý počet klinických vzorků.

Počet klinických vzorků	Objem BKV tender MMx	Počet potřebných zkumavek pro BKV tender MMx	Objem Mg 16	Počet potřebných zkumavek pro Mg 16
1 - 5	110 µl	1	110 µl	1
6 - 13	220 µl	2	220 µl	1
14 - 21	330 µl	3	330 µl	1
22 - 29	440 µl	4	440 µl	1
30 - 37	550 µl	5	550 µl	1
38 - 45	660 µl	6	660 µl	1

4.2.1.2.2 Krok II: Příprava zkumavek k PCR reakci

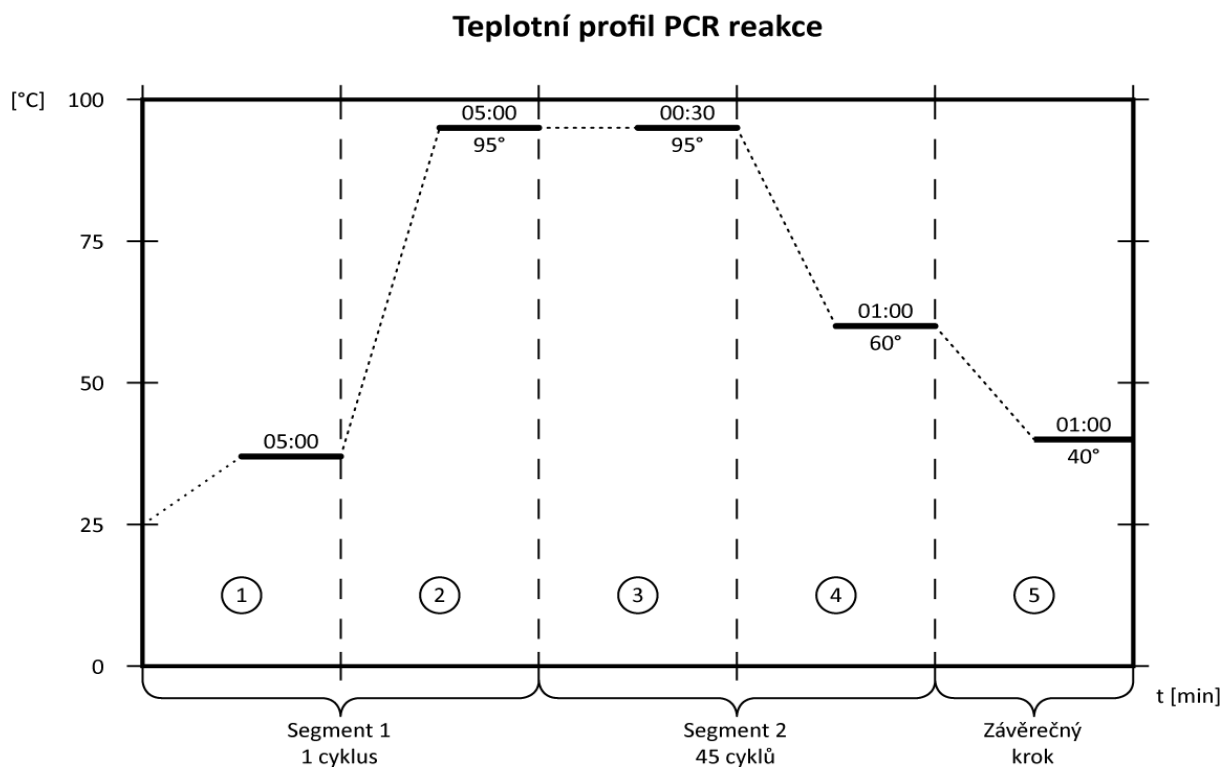
1. 25 μ l pracovní matice bylo přidáno do potřebného počtu zkumavek „PCR reaction tube“ (tj. do reakční zkumavky na extrahované vzorky DNA, pro negativní kontrolu a oba kalibrátory).
2. Do vyhrazených PCR zkumavek pak bylo přidáno 25 μ l extrahovaného klinického vzorku, 25 μ l BKV trender Low, BKV trender High nebo DNA NTC.
3. Poté byly zkumavky řádně promíchány, aby obsah zkumavek nezůstal na stěnách.

4.2.1.2.3 Krok III: Amplifikace a kvantifikace DNA

Před začátkem bylo nutné provést základní nastavení cycleru, nastavit snímání požadovaných kanálů (rozmezí vlnových délek pro FAM/Sybr/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red), zadat teplotní a fluorescenční profil, přiřadit potřebné informace k jednotlivým pozicím v rotoru (kalibrátory, negativní kontrola, klinické vzorky) a nastavit parametry pro analýzu (treshold pro BKV a pro vnitřní kontrolu).

Amplifikace DNA proběhla v cycleru Rotor-Gene™ 3000/6000 za následujících reakčních podmínek: první reakční cyklus 5min 37°C, 5min. 95°C., dalších 45 cyklů 30s 95°C a 60s 60°C, závěrečný krok 1min na 40°C (obr. 11), reakční objem 50 μ l.

Obr. 11. Teplotní profil PCR reakce



1. První krok při teplotě 37 °C je tzv. UDG krok. Probíhá v případě, kdy reagentie obsahují UDG (Uracil-DNA-glykosyláza). UDG štěpí kontaminující DNA enzymatickou excizí uridinů, čímž je tato DNA destabilizována a dále se neamplifikuje.
2. Druhý krok trvá 5 minut, probíhá při 95 °C a dochází při něm k denaturaci UDG a aktivaci DNA polymerázy.
3. 30 sekund při 95 °C je první krok z opakujících se cyklů, při této teplotě dochází k denaturaci templátové dsDNA.
4. 60°C po dobu 1 minuty jsou reakční podmínky, které dovolují annealing a extenzi primerů pomocí DNA polymerázy.
5. Závěrečný krok

Kvantifikace DNA: threshold pro BKV - k dosažení úrovně Ct = 15,7 byl threshold nastaven na BKV trender high, NTC threshold =13%, threshold pro vnitřní kontrolu: amplifikační křivka byla označena v místě, kde je hodnota Cycle pro BKV trender NTC rovna 30,0.

Objem vzorku před extrakcí DNA: 200 µl, Eluční objem po extrakci DNA: 60 µl, reakční objem 50 µl.

Charakteristiky cycleru Rotor-Gene™ 3000/ 6000:

LOD za předpokladu 100% výtěžnosti přípravy vzorku a při použití vzorku o objemu 200 µl a eluce do 60 µl odpovídá 102 kopií/ml.

Kvantitativní rozsah pro affigene® BKV trender je $1,0 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^8$ kopií/ml při použití 200 µl séra.

Inkluzivita pro affigene® BKV trender: všechny sérotypy viru BKV 1-4 jsou produktem affigene®BKV trender detekovány, nejrozšířenější sérotyp BKV - sérotyp 1 je detekován s vyšší účinností než sérotypy 3 a 4.

Exkluzivita pro affigene® BKV trender posouzena analýzou in silico relevantních patogenů: Nebyla zjištěna křížová reaktivita pro: SV40; JCV; HHV-6; HHV-7; HHV-8; VZV; HSV-1; HSV-2; HPV6b; Adenovirus typu 2; EBV; CMV; VZV; Candida albicans a Aspergillus niger.

Kalibrační křivka: U produktu affigene® BKV trender dva kalibrátory („BKV trender High“ a „BKV trender Low“) vytvářejí kalibrační křivku.

4.2.2 PCR protokol laboratoře Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej

Vzorek plasmy (cca. 8ml) odebraný do zkumavky na separaci plasmy (EDTA VACUETTE ®) byl centrifugován (1500g, 20min) a supernatant zamražen při -20°C. Po nashromáždění dostatečného množství vzorků byly zamražené vzorky na suchém ledu odeslány do Basileje k analýze.

DNA byla extrahována ze 400µl vzorku. Analýza proběhla za použití real-time PCR fluorescent probe-based assay:

primer 1: AGCAGGCAAGGGTTCTATTACTAAAT;

primer 2: GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA;

sonda: AAGACCCTAAAGACTTTCCTCTGATCTACACCAAGTTT

značená 6-carboxyfluoresceinem na 5' konci a 6-carboxytetramethylrhodaminem na 3' konci v cycleru ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems za následujících reakčních podmínek: 1 cyklus při 50°C 2 min, 1 cyklus při 95°C 15 min a 45 cyklů: denaturace při 94°C 15s, annealing a detekce při 56°C 30s, extenze 76°C 30s, reakční objem 50µl.

Kvantitativní lineární rozsah pro tuto metodu je 10^1 - 10^7 kopií/reakci (76) (139).

4.3 Statistická analýza

Pro porovnání výsledků dvou metod byl použit Spearmanův rank-korelační statistický test, počítán pomocí (Wessa, P. (2010), *Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r6*, URL <http://www.wessa.net/>) a Bland-Altman plot (MedCalc software Belgium, verze 11.1.1.0).

4.4 Výsledky

Ze 100 vzorků séra a plasmy odebraných ve stejnou dobu analyzovaných následně podle Affigene® BKV trender a Transplantační virologie, Basilej real-time PCR protokolů (Tab.3) bylo 67 vzorků negativních, 3 hraniční a 25 pozitivních oběma metodami. Shoda obou metod byla 95% (Tab. 4).

Tabulka 3. Výsledky měření použité k hodnocení korelace obou metod

Číslo vzorku	Počet kopií BKV/ml		Log počtu kopií BKV/ml	
	Transplantační virologie, Basilej PCR protokol (Plasma)	Affigene® BKV trender (Sérum)	Transplantační virologie, Basilej PCR protokol (Plasma)	Affigene® BKV trender (Sérum)
1	1375	2485	3,138302698	3,395326393
2	107615	217650	5,03187281	5,337758671
3	68183	99652	4,833676106	4,998486019
4	1495480	588952	6,174780609	5,770079901
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	214	0	2,330413773
10	477797	1220000	5,679243419	6,086359831
11	767018	2130000	5,884805556	6,328379603
12	6937	4340	3,841171694	3,63748973
13	0	0	0	0
14	0	5370	0	3,729974286
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	6330500	21380262	6,801438013	7,330013023
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	691128	2460000	5,839558488	6,390935107
24	0	0	0	0
25	24357	58000	4,386623796	4,763427994
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	44000	522000	4,643452676	5,717670503
29	0	0	0	0
30	32213	249000	4,508031173	5,396199347
31	0	0	0	0
32	1809950	15649721	6,257666578	7,194506599
33	0	0	0	0
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0
38	0	0	0	0
39	0	0	0	0
40	0	0	0	0

41	0	0	0	0
42	16359800	1256100	7,21377799	6,099024216
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	0	0	0	0
47	0	0	0	0
48	1607070	289700	6,206034794	5,461948495
49	0	910	0	2,959041392
50	0	0	0	0
51	0	0	0	0
52	79530	56197	4,900530982	4,749713132
53	0	0	0	0
54	105047	5570	5,021383654	3,745855195
55	0	0	0	0
56	0	0	0	0
57	0	0	0	0
58	0	0	0	0
59	64667	8630	4,810682714	3,936010796
60	15668	133570	4,195013563	5,125708926
61	16677	10519	4,222117929	4,021974455
62	0	0	0	0
63	0	0	0	0
64	0	0	0	0
65	0	0	0	0
66	0	0	0	0
67	15186	192	4,181443396	2,283301229
68	378813	11751	5,578424875	4,070074826
69	0	0	0	0
70	0	0	0	0
71	0	0	0	0
72	0	0	0	0
73	0	0	0	0
74	0	0	0	0
75	95600	55802	4,980457892	4,746649765
76	1070000	901110	6,029383778	5,954777809
77	0	120	0	2,079181246
78	0	0	0	0
79	0	0	0	0
80	0	0	0	0
81	0	0	0	0
82	0	0	0	0
83	98560	102690	4,993700695	5,011528154
84	0	0	0	0
85	0	0	0	0
86	14890	47200	4,172894698	4,673941999
87	880	1390	2,944482672	3,1430148
88	6122300	1268001	6,786914607	6,103119596
89	0	0	0	0

90	0	0	0	0
91	0	0	0	0
92	600	790	2,77815125	2,897627091
93	2840	3150	3,45331834	3,498310554
94	0	0	0	0
95	0	320	0	2,505149978
96	0	0	0	0
97	40390	77160	4,606273853	4,887392219
98	2999800	4900100	6,477092301	6,690204943
99	101200	666103	5,005180513	5,82354139
100	960	1489	2,982271233	3,172894698

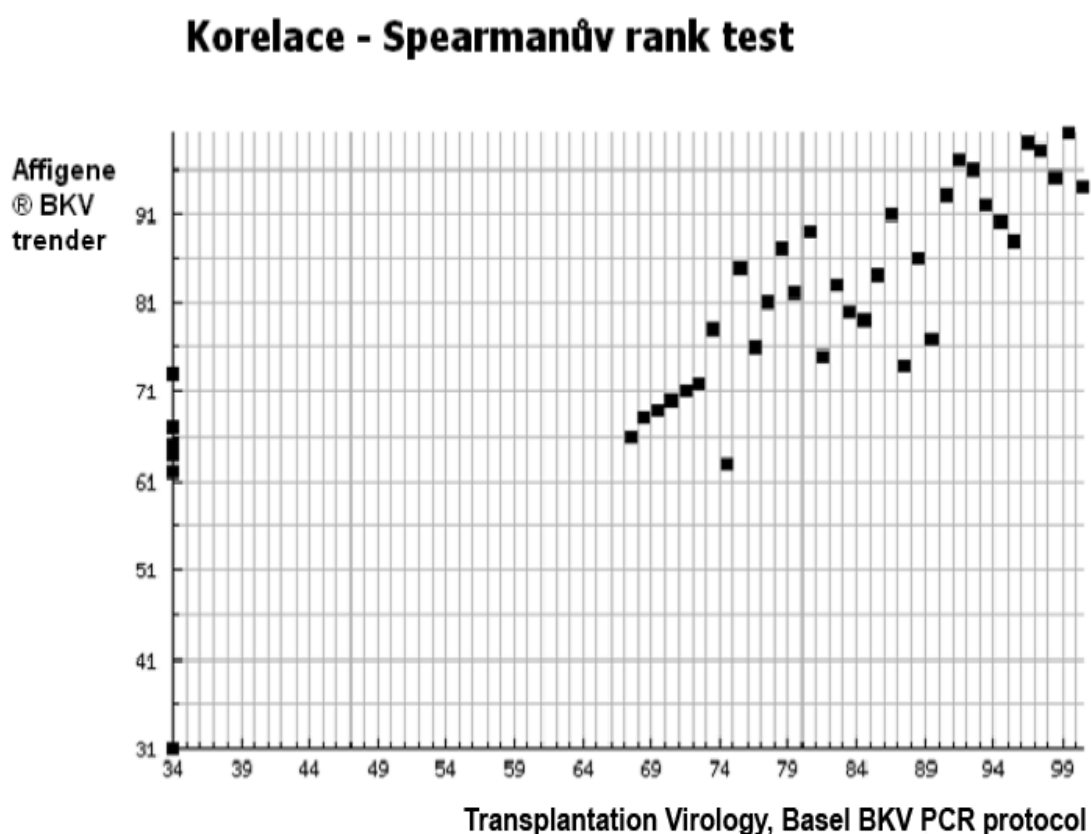
Tabulka 4. Srovnání počtu negativních, hraničních a pozitivních výsledků měřených oběma metodami

	Transplantační virologie, Basilej PCR protokol (Plasma)	Affigene® BKV trender (Sérum)	Shoda v obou metodách
Negativní	69	67	67
Hraniční	3	8	3
Pozitivní	28	25	25
Celkem	100	100	95

Spearmanův korelační koeficient (Rho) byl použit pro porovnání párových hodnot, z nichž alespoň jedna byla nenulová, s výsledkem signifikantní korelace: $Rho = 0,946$, 95% interval spolehlivosti (CI): $0.920 - 0.963$, $P < 0,0001$ (Graf 1).

Graf 1. Korelace párových hodnot kopií BKV v séru a v plasmě (n=34)

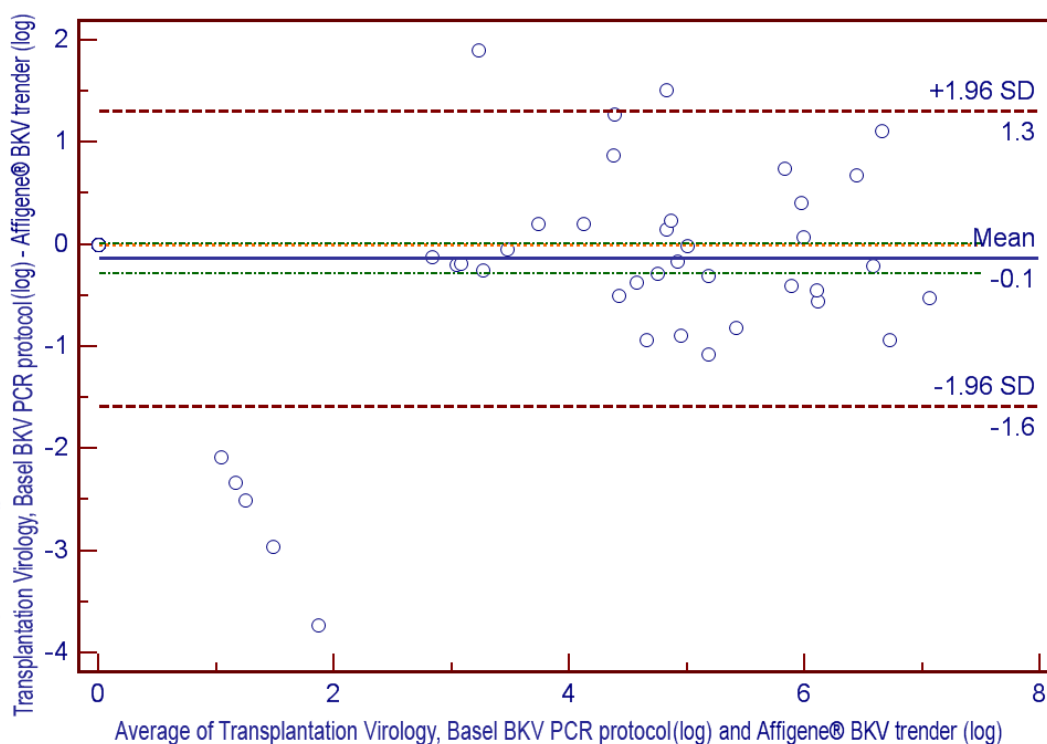
Porovnání výsledků BK-virémie vyšetřované v séru a plasmě pomocí Affigene® BKV trender a metody vyvinuté laboratoří Transplantační virologie, Basilej. Jednotlivé body v grafu reprezentují korelaci výsledků jednotlivých měření, kde aspoň jeden výsledek z dané dvojice měření byl nenulový.



Bland–Altman plot analýza rovněž neprokázala signifikantní rozdíl mezi oběma metodami (bias Transplantační virologie, Basilej PCR protokol/Affigene® BKV tender: -0,1 (průměr) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3]) pro obě metody (Graf 2).

Graf 2. Bland-Altman plot

Osa x zobrazuje průměr hodnot BK-virémie získané oběma metodami (log kopií BKV), osa y pak ukazuje rozdíl mezi výsledky BK-virémie získanými oběma metodami (log kopií BKV). Horizontální linie označuje průměr rozdílů (plná modrá čára) a plus nebo minus 1,96 směrodatné odchylky (SD) rozdílů (hnědé přerušované linie). S výsledným log kopií BKV je nadále počítáno jako s přirozeným číslem, proto jsou možné i záporné hodnoty.



4.5 Diskuse

Cílem této studie bylo porovnání výsledků vyšetření BK virémie dle nově zavedeného, komerčně dostupného PCR protokolu Affigene® BKV trender v IKEM s metodou vyvinutou v předním evropském virologickém centru (Institute for Medical Microbiology, Transplantation Virology, Basel, Switzerland).

Oba protokoly byly podobné co se týče složení použitých reagensů, amplifikačních programů, detekce a kvantifikace vyšetřované DNA. Metoda používaná v Basileji je dle autorů podobná komerčně dostupnému Taq-Man® Applied Biosystems BKV PCR protokolu (139). Obě metody byly založeny na technologii hydrolýzy sondy (hydrolysis probe technology), která využívá 5'-3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy a je ozančována jako hydrolýza sondy (hydrolysis probe). Tato metoda se ukázala dle výsledků jiných prací být velmi vhodná ke kvantifikaci DNA. PCR protokoly, a to jak navržené v jednotlivých centrech („home-made“), tak ty komerčně dostupné, byly testovány i k detekci ostatních virů, např. CMV, EBV, HHV6 a BKV s velmi dobrými výsledky vzájemné korelace (Spearmanův korelační koeficient (Rho): 0.85 - 0.98 pro všechny porovnávané metody) (140). Naopak Affigene® CMV trender byl v recentní studii porovnáván s Abbott® CMV real-time PCR Kit, kde metodou Affigene byly naměřeny signifikantně vyšší počty kopií CMV DNA než při použití Abbott CMV real-time PCR kitu bez ohledu na použitou metodiku extrakce DNA (141).

V naší studii byla prokázána vysoká míra korelace počtu kopií BK viru vyšetřované výše zmíněnými metodami s hodnotou korelačního koeficientu (Rho) = 0,946 při 95% intervalu spolehlivosti (CI): 0.920 – 0.963. Ani analýza dle Bland-Altmana neprokázala výraznější diskrepance výsledků obou metod. Rozdíly hodnot v rozmezí počtu BKV DNA kopií < 3,0 log nejsou posuzovány jako klinicky relevantní (negativní výsledky) a v mnoha případech byly opomíjeny zcela (výsledek zapsán jako <1000 kopií/ml), v 5 případech (5%) byla diskrepance v klinicky významném rozmezí (Tab. 3); u čtyř měření by rozdíl hodnot ovlivnil klinický přístup (negativní vs. hraniční virémie: vzorek č. 14, negativní vs. pozitivní virémie: vzorek č. 67, hraniční vs. pozitivní virémie: vzorky č. 54, 59). V jednom případě (vzorek č. 68) rozdíl hodnot v rozmezí pozitivní virémie přesahuje $1.0 \log_{10}$.

4.6 Shrnutí

V rámci své výzkumné práce jsem zavedla Affigene® BKV PCR protokol v IKEM k rutinní diagnostice BK virémie a provedla jsem měření 100 vzorků za účelem testování přesnosti nově zavedené metody proti metodě vyvinuté a dlouhodobě používané v laboratoři Transplantační

virologie Institutu pro lékařskou mikrobiologii, Basilej, která patří mezi světově uznávaná výzkumná a referenční centra v oblasti virologie a diagnostiky virových onemocnění.

Nově zavedená metoda je svými výsledky plně srovnatelná s výsledky analýzy provedené v laboratoři Transplantační virologie v Basileji. Na základě výsledků vyšetření této laboratoře byly stanoveny terapeuticky relevantní referenční hodnoty BK-virémie (80).

5 Studie 2

Stanovení prevalence a testování rizikových faktorů replikace BK-polyomaviru u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu.

5.1 Úvod a hypotéza

BK-virová intersticiální nefritis transplantované ledviny (BKVN) patří u pacientů po transplantaci samotné ledviny k hlavním příčinám selhání funkce štěpu (79) (142). Dle recentních terapeutických doporučení je nejdůležitějším opatřením včasná redukce dávek imunosupresivních léků, neboť stále chybí účinné antivirotikum. Pro včasnou terapeutickou intervenci byla navržena systematická skrínigová vyšetření replikační aktivity BK viru na základě PCR metod nebo cytologického vyšetření moči. Každá z těchto skrínigových metod i algoritmů má své výhody i svá úskalí, doposud však nebyla navržena žádná standardizovaná metoda ani algoritmus (80) (126). Kvantifikace BKV DNA v plasmě (séru) a/nebo moči však patří mezi nejčastěji doporučované skrínigové metody (80) (126) (143). Vzhledem k fokálnímu charakteru časných stádií BKVN v histologickém obraze je BK virémie $>10^4$ /mL persistující déle než 2 týdny posuzována jako “presumptive BKVN” (80) (144).

Na rozdíl od příjemců ledviny je BKV infekci a BKVN u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) věnováno podstatně méně publikací (133) (135) (136) (137) a data ohledně incidence, prevalence a rizikových faktorů jsou nekoherentní. SPK příjemci se také v mnoha ohledech liší od nediabetických pacientů po transplantaci ledviny (např. typem preparátů i intenzitou imunosupresivní terapie, rizikem rejekce štěpu pankreatu po případné redukci IS terapie, příjemci mají diabetes mellitus 1. typu atd.).

Data pocházejí převážně z retrospektivních studií a údaje o incidenci i prevalenci BKVN se mezi jednotlivými centry velmi liší. Navíc v žádné z těchto studií nebyla věnována pozornost výskytu a časovému průběhu BK-virémie a virurie, což jsou klíčové informace pro návrh systematického skrínigového protokolu.

Vzhledem k těmto skutečnostem jsme provedli průřezovou, prospektivní studii replikační aktivity BK viru v moči a plasmě a analyzovali jsme rizikové faktory BKV replikace a BKVN u SPK příjemců léčených v našem centru.

5.2 Metodika

5.2.1 Provedení studie

Do studie byli zařazeni všichni pacienti s alespoň jedním funkčním štěpem, kteří podstoupili SPK v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze v období 12/1985-03/2008 (n=205; u 179 pacientů fungovaly oba štěpy, 21 pacientům fungoval pouze štěp ledviny a 5 pacientů bylo dialyzováno s funkčním štěpem pankreatu). Pacienti po re-transplantaci ledviny (n=19) a/nebo pankreatu (n=3) byli ze studie vyřazeni. Vzorek moči a krve byl získán od zbývajících 183 pacientů při rutinní laboratorní kontrole v období 01. Května 2006 – 31. Března 2008. Pacienti, kteří byli nově transplantováni v tomto období (n=25) byli do studie zařazeni také. Studie byla řádně schválená lokální etickou komisí a od všech zařazených pacientů byl získán informovaný souhlas.

Počet kopií BKV v moči a plasmě/séru byl kvantifikován pomocí real-time PCR metod, které jsou popsány ve studii 1, stanovení virurie probíhalo pouze v laboratoři Transplantační virologie, Basilej. Počet kopií $<10^3$ /mL byl posuzován jako negativní v obou vzorcích, virémie 10^3 - 10^4 kopií/mL jako hraniční a $>10^4$ jako pozitivní. Virová nálož BKV v moči 10^3 - 10^7 byla posuzována jako hraniční a nad 10^7 kopií/mL jako pozitivní nález. Pacienti s jakoukoli nenulovou hodnotou BK-virémie a/nebo virurie byli znovu vyšetřeni po 4-13 měsících, jejich klinický stav a hodnota sérového kreatininu byly znovu stanoveny po 6 měsících (Tabulky 7 a 8). Virémie i virurie $> 10^3$ kopií/mL byly hodnoceny jako pozitivní replikace BKV. Při opakovaně pozitivním nálezu BK-virémie byla provedena biopsie štěpu ledviny s barvením na SV40 antigen. Rutinní vyšetření na SV40 u všech biopsií ledvinných štěpů se v našem centru provádí až od února 2009. Pacienti, kteří byli iniciálně negativní v plasmě i v moči, byli znovu vyšetřeni cca. po jednom roce.

5.2.2 Imunosupresivní terapie

V časném období po transplantaci byly všem pacientům podávány vysoké dávky methylyprednisolonu. Indukční léčba proběhla u 173 pacientů; polyklonální protilátky proti T-lymfocytům byly podány 156 pacientům, OKT3 4 příjemcům a 13 pacientům byl podán daclizumab. Protokoly dlouhodobé imunosupresivní terapie (IS) byly celkem 3: v *prvním období* (1987-1998) byli pacienti léčeni kombinací cyklosporin A (CyA) s azathioprinem nebo mykofenolát mofetilem (MMF) a steroidy. V *druhém období* (1998-2002) byli pacienti léčeni kombinací CyA/MMF nebo tacrolimus (Tac)/MMF, steroidy byly vysazeny nejpozději 6 měsíců od SPK, dle protokolu studie EURO SPK 001 (145). Ve *třetím období* (2002-2007) IS terapie zahrnovala tacrolimus buď s MMF nebo se sirolimem s vysazením steroid do 6 týdnů od SPK dle protokolu studie EURO SPK 002 (146). Iničiální dávkování cyklosporinu A bylo 7 mg/kg/den, plasmatické hladiny byly poté udržovány v rozmezí 150-250 ng/mL

prvních 6 měsíců a 100-200 ng/mL později. Tacrolimus byl iniciálně podáván v dávce 0.2 mg/kg/den, prvních 6 měsíců byly plasmatické hladiny udržovány v rozmezí 8-15 ng/mL, poté 5-10 ng/mL. Počáteční denní dávkování azathioprinu bylo 1-2 mg/kg, MMF 2g/den stabilně po celou dobu sledování. Sirolimus byl podáván v iniciální dávce 0,2mg/kg, cílové plasmatické hladiny pak udržovány v rozmezí 5-10 ng/mL po celé období.

5.3 Statistická analýza

Identifikovali jsme pacienty s BKV pozitivitou v plasmě a/nebo v moči a na základě tohoto výsledku jsme spočítali průřezovou prevalenci (cross-sectional point-prevalence).

Rizikové faktory BKV replikace byly analyzovány pro skupinu pacientů transplantovaných v období po 23.11.1998, kdy začal být v našem centru podáván tacrolimus. Univariantní analýza byla provedena pomocí Mann-Whitney testování pro spojitá data a chí-kvadrát test nebo Fischerův exact test pro kategorická data. Faktory asociované s BKNV dle již publikovaných studií a/nebo korelující signifikantně s pozitivní BKV-replikací ve výsledcích univariantní analýzy ($p < 0,10$) byly testovány v multivariantním modelu logistické regresní analýzy. Nezávisle proměnnou veličinou byla přítomnost BK-virémie a/nebo virurie. BMDP statistický software (BMDP Statistical Software, Inc., UCLA, Los Angeles, CA, USA) byl použit pro všechny statistické výpočty.

5.4 Výsledky

Prevalence BKV-replikace ("point prevalence") byla analyzována u 183 pacientů, kteří byli 49 (medián, rozsah 1-250) měsíců od SPK (Tabulka 5). Vzorek moči nebyl získán od 21 pacientů. Virurie byla detekována u 28 pacientů (17,3 %; medián počtu BKV DNA kopií v moči $1,16 \times 10^4$ /mL; rozsah ($1,42 \times 10^3$ - $5,0 \times 10^8$)), virémie byla zjištěna u 7 pacientů (3,8%; medián počtu BKV DNA kopií v plasmě $1,46 \times 10^3$ /mL; rozsah ($1,1 \times 10^3$ - $6,0 \times 10^6$)). Všichni pacienti s pozitivní virémií ($n=7$) měli rovněž pozitivní virurii. Pozitivní virurie $>10^7$ kopií/mL byla detekována u 6 pacientů (3,7%; počet kopií BKV DNA v moči $7,81 \times 10^7$ /mL; rozsah ($1,04 \times 10^7$ – $5,17 \times 10^8$)). Virémie $>10^4$ byla pozorována u 3 pacientů (1,6%; $1,6 \times 10^4$, $5,76 \times 10^5$ a $5,6 \times 10^6$ kopií/mL), současně s vysoce pozitivní virurií ($5,6 \times 10^7$, $>1,0 \times 10^8$ a $5,2 \times 10^8$ kopií/mL).

Iniciálně negativní pacienti v plasmě i v moči ($n=129$) byli re-testováni po 15 měsících (medián), rozsah (8-20 měsíců). Změna směrem k BK-pozitivitě byla zaznamenána u 12 pacientů (což by

odpovídalo hodnotě „Incidence-rate“ 0,074 na paciento/rok). Všichni pacienti kromě jednoho měli pouze hraniční BKV replikaci v moči a negativní v plasmě, jeden měl hraniční počet BKV DNA v plasmě a u jednoho byla potvrzena vysoce pozitivní BK-virurie při negativním nálezů v plasmě. U žádného z těchto pacientů nedošlo k rozvoji BKVN.

Tabulka 5. Demografická data pacientů a výsledky průřezové prevalenční studie

Počet pacientů	183
Muži/ ženy	101/82
Věk(roky)	43±8.6
Trvání diabetu (roky)	27±7.9
Doba od SPK(měsíce)	49 (1 - 250)*
Nezávislost na inzulínu	159 (87%)
Kreatinin (μmol/L)	129 (66-500#)*
Plazma	
Pozitivní BKV replikace (n)	7 (3.8%)
Kopie/mL	1.46E+03 (1.1E+03 - 6.0E+06)*
Vysoce-pozitivní replikace (n)	3 (1.6%)
Hraniční replikace (n)	4 (2.2%)
Moč	
Pozitivní BKV replikace (n)	28 (17.3%)^
Kopie/mL	1.16E+04 (1.42E+03 - 5.0E+08)*
Vysoce-pozitivní replikace (n)	6 (3.7%)^
Hraniční replikace (n)	22 (13.6%)^
BKVN (n) (potvrzená biopsií)	1 (0.5%)

Hodnoty jsou průměr ± SD

* medián (rozsah)

pro 5 dialyzovaných pacientů byla hodnota kreatininu 500 μmol/L

^ Vzorek moči nebyl k dispozici od 21 pacientů

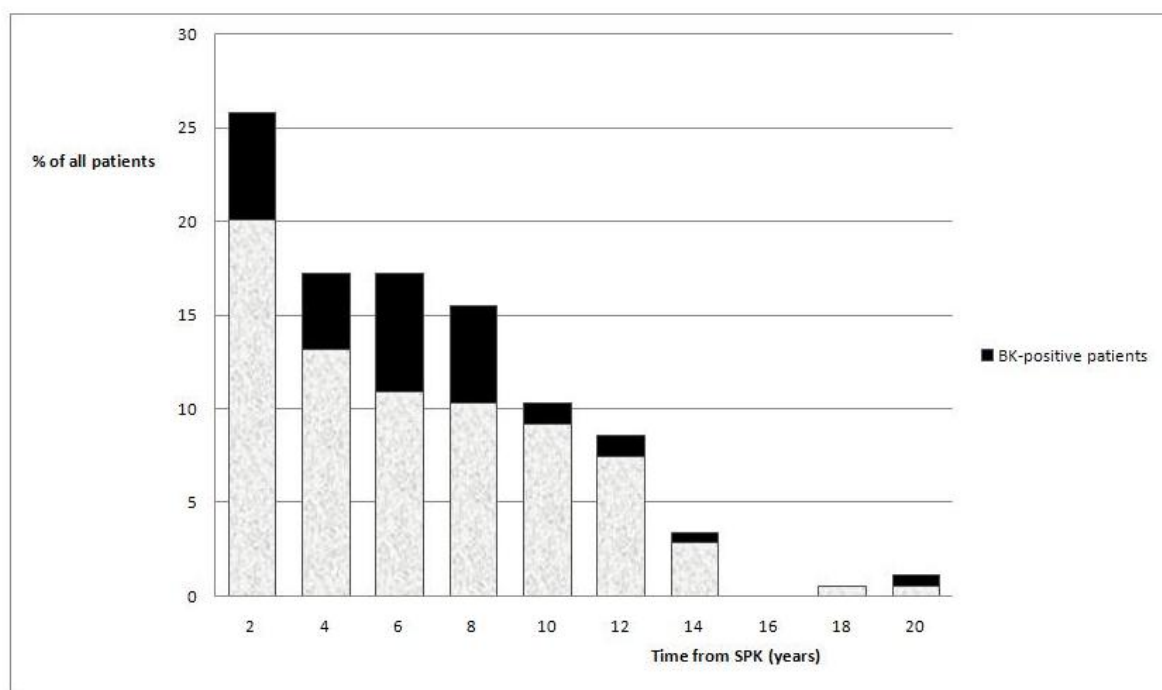
SPK – Kombinovaná transplantace ledviny a pankreatu

BKV - polyomavirus BK

BKVN - polyomavirus BK-associated nephropathy

Relativní distribuce BK-positivních a BK-negativních pacientů vztahená k času od transplantace je uvedena v grafu 3. Největší procenta pozitivních pacientů se nacházejí v prvních čtyřech intervalech (à 2 roky) od transplantace.

Graf 3. Relativní distribuce BK-positivních a BK-negativních pacientů vzhledem k času od transplantace



Rizikové faktory BKV replikace byly analyzovány u 135 pacientů. Posuzovali jsme věk, trvání diabetu, trvání dialýzy před transplantací, dobu studené ischemie štěpu ledviny, celkový počet neshod v HLA, čas nástupu funkce štěpu (méně vs. déle než 3 dny od SPK), dobu od transplantace, iniciační IS (Tac vs. CyA), nutnost antirejekční terapie, IS v době odběru vzorků (Tac vs. CyA) a hodnotu sérového kreatininu v čase studie (Tabulka 6). V univariantsní analýze vyšel signifikantní rozdíl mezi BKV-positivní vs. BKV-negativní skupinou ve 3 veličinách (trvání diabetu a dialýzy před transplantací a opožděný nástup funkce štěpu ledviny) (Tabulka 6), pouze trvání diabetu před SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p=0.028$) a opožděný nástup funkce štěpu ledviny (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p=0.0085$) však byly v multivariantsní analýze nezávisle asociovány s replikací BKV. Na rozdíl od výsledků z jiných center typ IS nevyšel jako nezávislý rizikový faktor a nebyl rovněž signifikantní rozdíl v počtu BKV-positivních pacientů v jednotlivých obdobích IS léčby (data zde nejsou uvedena).

Tabulka 6. Charakteristiky BKV-pozitivních a BKV-negativních pacientů

n=135	BKV pozitivní (n=36)	BKV negativní (n=99)	Hodnota - P
Muži/ženy	19/17	59/40	0.478
Věk (roky)	44±8.5	42±8.4	0.186
Trvání diabetu (roky)	28.8±8.2	25.8±7.5	0.044
Trvání dialýzy (měs.)	13.8±15	8.1±10.7	0.026
Studená ischemie (hod.)	11.3±4.1	10.5±3.5	0.399
Počet HLA neshod	5±1	4.7±1	0.128
Opožděný*/okamžitý nástup funkce štěpu (n)	14/22	18/81	0.012
Doba od SPK (měs.)	47(2-96)**	43(0.6-106)**	0.516
Iniciální imunosuprese (n)			
Tac/CyA	26/10	55/44	0.081
Antirejekční terapie (n)	2/34	15/84	0.233
Imunosuprese v době studie(n)			
Tac/CyA	27/9	62/37	0.18
Kreatinin (μmol/l)	118 (60 – 500)** 1 patient on dialysis	126 (69 – 500) ** 2 patients on dialysis	0.913

Data jsou průměr ± směrodatná odchylka

* více než 3 dny

**medián (rozsah)

Tac = tacrolimus; CyA = cyklosporin A

Laboratorní parametry a klinický průběh u pacientů s prokázanou hraniční replikací BKV

Laboratorní výsledky a klinická data 22 pacientů s hraniční BK virurií-medián (rozsah) 6.77E+03 (1.08E+03 - 1.57E+06) kopií/mL – v prevalenční průřezové studii jsou shrnuta v tabulce č. 7. Kromě pacienta č. 4 měli tito pacienti negativní virémii. Vzhledem k nízkému počtu BKV DNA v moči a nepřítomnosti replikace viru v plasmě nebyly u těchto pacientů prováděny žádné změny v IS režimu. Při následující kontrole po medián (rozsah) 11.5 (8-13) měsících u žádného pacienta nedošlo k nárůstu virurie k vysoce pozitivním hodnotám, virurie byla negativní u 11 (50%) pacientů a všichni měli při této kontrole negativní virémii. Klinicky signifikantní vzestup hodnot plasmatického kreatininu ($\geq 20\%$) na konci studie (6 měsíců po re-testování) nastal u dvou pacientů (č. 3 a 6). Oba tito pacienti však byli v době re-testování PCR-negativní, zhoršení funkce štěpu bylo proto připisováno jiným příčinám (chronická rejekční nefropatie u jednoho a kombinace chronických rejekčních změn a rekurence diabetické nefropatie v druhém případě).

Tabulka 7. Demografické údaje pacientů s iniciálně hraniční hodnotou BK virurie

Pacient č.	Pohlaví	Věk v době SPK (roky)	Trvání diabetu (roky)	Doba od SPK do první studie (měs.)	Plasma (kopie/mL)	Moč (Kopie/mL)	Kreatinin (μmol/l)	Doba od prvního testování do re-testování (měs.)	Plasma (kopie/mL)	Moč (kopie/mL)	Kreatinin (μmol/l)	Kreatinin 6 měs. po re-testování (μmol/l)	IS
1	F	33	15	87	<1.0E+03	7.38E+03	164	12	<1.0E+03	2.43E+04	148	170	CyA, MMF
2	F	39	25	30	<1.0E+03	1.79E+05	105	11	<1.0E+03	2.21E+04	93	90	Tac, MMF
3	F	52	44	10	<1.0E+03	1.13E+05	120	12	<1.0E+03	<1.0E+03	193	230	Siro, MMF
4	F	53	41	3	1.16E+03	7.84E+05	100	11	<1.0E+03	2.9E+04	84	92	Tac, MMF
5	F	40	22	4	<1.0E+03	1.59E+04	95	12	<1.0E+03	1.2E+05	100	89	Tac, MMF
6	F	36	21	250	<1.0E+03	5.07E+03	220	11	<1.0E+03	<1.0E+03	230	310	CyA, Aza
7	F	40	25	64	<1.0E+03	1.27E+03	160	12	<1.0E+03	<1.0E+03	152	140	Siro, MMF
8	F	64	38	62	<1.0E+03	1.16E+04	148	13	<1.0E+03	<1.0E+03	150	160	CyA, MMF
9	F	31	15	43	<1.0E+03	1.57E+06	132	11	<1.0E+03	1.1E+05	160	130	Tac, MMF
10	F	45	30	89	<1.0E+03	4.34E+03	121	12	<1.0E+03	3.1E+03	111	129	Tac, MMF
11	M	35	21	112	<1.0E+03	1.3E+03	191	12	<1.0E+03	<1.0E+03	105	150	CyA, MMF
12	M	41	26	126	<1.0E+03	1.24E+03	114	10	<1.0E+03	<1.0E+03	120	130	CyA, Aza
13	M	48	43	82	<1.0E+03	1.63E+04	139	12	<1.0E+03	1.57E+03	128	132	Tac, MMF
14	M	33	22	56	<1.0E+03	8.11E+04	136	13	<1.0E+03	5.00E+04	153	160	CyA, MMF
15	M	45	27	76	<1.0E+03	1.37E+03	150	8	<1.0E+03	<1.0E+03	147	138	CyA,MMF
16	M	54	25	83	<1.0E+03	9.34E+03	105	12	<1.0E+03	<1.0E+03	110	103	Tac, MMF
17	M	38	23	84	<1.0E+03	1.77E+03	104	11	<1.0E+03	<1.0E+03	88	88	CyA, MMF
18	M	54	22	86	<1.0E+03	6.15E+03	105	10	<1.0E+03	3.91E+03	92	95	CyA, MMF
19	M	48	46	53	<1.0E+03	4.1E+03	122	9	<1.0E+03	6.04E+03	117	109	CyA, MMF
20	M	46	24	49	<1.0E+03	1.68E+03	129	10	<1.0E+03	7.7E+03	96	104	Tac, MMF
21	M	45	30	33	<1.0E+03	2.12E+05	147	13	<1.0E+03	<1.0E+03	143	143	Tac, MMF
22	M	61	39	19	<1.0E+03	1.08E+03	140	11	<1.0E+03	<1.0E+03	115	122	CyA, MMF

Tac - tacrolimus, CyA - cyklosporin A, Aza - azathioprin, MMF - mykofenolát mofetil, Siro - sirolimus
IS - imunosuprese

Laboratorní výsledky a klinická data pacientů s pozitivní BKV replikací jsou uvedena v tabulce 8. Vysoce pozitivní virurie a zároveň virémie potvrzená opakovaným vyšetření byla popsána u dvou pacientů (pacienti č. 5 a 6). U pacienta č. 5 byly redukovány dávky IS (tacrolimu i MMF) a podáván cidofovir, vysoce pozitivní virurie i virémie však i u tohoto pacienta přetrvávaly a v biopsii byla potvrzena BKNV stádium B. Během 6 měsíců od posledního kontrolního vyšetření u tohoto pacienta byla stabilní funkce štěpu pouze s mírným nárůstem hodnoty sérového kreatininu.

Pacient č. 6 měl persistující vysoké hodnoty virurie i virémie, tj. “presumptive BKNV”, i přes snížení dávky tacrolimu a podávání cidofoviru u něj došlo k progresi dysfunkce štěpu a jeho selhání 19 měsíců o prvního záchytu vysoké replikační aktivity BKV. BKNV byla s nejvyšší pravděpodobností příčinou ztráty funkce štěpu u tohoto pacienta, i když v opakovaných biopsiích nebyl nikdy zachycen SV40T antigen a byly zde popsány pouze chronické, T-buňkami zprostředkované rejekční změny s těžkou intersticiální fibrozou. Ani v explantovaném štěpu nebyly popsány známky BKV replikace. Explantace štěpu proběhla 8 měsíců od začátku dialyzační léčby.

U ostatních pacientů nebylo popsáno zhoršení funkce štěpu. Vysoce pozitivní virurie a virémie u pacienta č. 3 a virurie u pacienta č. 1 byly pouze přechodné. Všichni výše zmiňovaní pacienti mají výbornou funkci štěpu pankreatu a v čase studie byli nezávislí na inzulinu.

Tabulka 8. Demografické údaje pacientů s pozitivní BKV replikací

Pacient č.	Pohlaví	Věk v době SPK (roky)	Trvání diabetu (roky)	Doba od SPK do 1.testování (měs.)	Plazma (kopie/mL)	Moč (kopie/mL)	Kreatinin (μmol/L)	Doba od 1.testování do re- testování (měs.)	Plazma (kopie/mL)	Moč (kopie/mL)	Kreatinin (μmol/L)	Kreatinin 6 měs. po testování (μmol/L)	IS	Stádium BKN v biopsii
1	M	32	24	14	1.1E+03	1.04E+07	97	6	<1.0E+03	8.56E+05	117	122	Tac, MMF	neprovedeno
2	F	35	23	5	1.62E+03	2.33E+07	123	6	2.56E+03	3.47E+07	120	115	Tac, Siro	neprovedeno
3	M	49	29	87	1.56E+04	5.61E+07	110	6	5.28E+03	1.52E+05	124	130	Tac, Aza	neprovedeno
4	M	51	33	17	1.29E+03	>1.0E+08	165	6	1.25E+03	1.02E+08	172	165	Tac, Siro	neprovedeno
5	F	42	36	4	5.76E+05	>1.0E+08	118	4	2.11E+06	4.1E+10	124	138	Tac, MMF	B**
6	M	37	29	35	5.6E+06	5.17E+08	133	4	1.37E+05	1.16E+07	180	290*	Tac, MMF	negativní

* 19 měs. po prvním testování došlo k selhání štěpu , grafektomie byla provedena 8 měs. po začátku dialýzy , Tac - tacrolimus, Aza - azathioprine, MMF - mykofenolate mofetil, Siro - sirolimus

** Staging BKN dle (94)

5.5 Diskuse

Hlavním cílem této prospektivní studie bylo zjistit četnost výskytu a rizikové faktory replikace BKV v populaci SPK příjemců v našem transplantačním centru. Na rozdíl od množství publikovaných informací o BKV infekci u převážně nediabetických příjemců samotné ledviny, nejsou k dispozici systematická data o průběhu BKV replikace a BKN u SPK příjemců. Při porovnání s výsledky průřezových studií u pacientů po transplantaci ledviny vyšly u našich pacientů srovnatelná četnost i hodnoty BK virurie, ale nižší výskyt i hodnoty BK virémie (83) (144) (147). Incidence-rate nově vzniklé BKV positivity při opakování odběrů u iniciačně negativních pacientů byla velmi nízká.

Pro srovnání, incidence biopsicky verifikované BKN u SPK příjemců provedené převážně jako retrospektivní sledování v jiných centrech byly 2,9% (133) – 7,5% (136). V našem centru nebyla incidence sledována retrospektivně, nicméně případy biopsicky verifikované BKN s následným selháním funkce štěpu a re-transplantací (5 případů BKN u 14 pacientů z celkem 16 re-transplantací) ukazují, že i v našem centru patří BKN mezi významné příčiny ztráty funkce štěpu ledviny u SPK příjemců. Vzhledem k poznatku, že konečné stádium BKN (stádium C dle (94)) může být neodlišitelné od selhání štěpu na podkladě jiném a vzhledem k tomu, že rutinní barvení na SV40 bylo

zavedeno až v Únoru 2009, došlo v našem centru velmi pravděpodobně k podhodnocení počtu BKNV jako příčiny selhání funkce štěpu.

Nízká prevalence vysoce pozitivní BKV replikace i BKNV v naší recentní studii může ukazovat i na její snižující se výskyt v SPK populaci. Myslíme si, že tento trend je patrný také při porovnání výsledků předchozích studií. Např. výsledky studií University of Tennessee, Memphis a University of California, San Francisco, které byly provedeny v období 1994-1998 (136) a 1996-2002 (135) ukazují relativně shodně vyšší incidenci BKNV (7,5 a 6,2%).

Zvyšující se povědomí o problematice BKV infekce a zkušenosti s preventivními a terapeutickými přístupy mohly již sehrát roli ve snížení výskytu BKNV, které je dokumentováno v novějších studiích. Gupta et al. (133) z University of Pittsburgh Medical Center a nejnovější práce Ison et al. (137) z Northwestern University Chicago již popisují v obdobích 2001-2004 a 2000-2006 incidenci BKNV pouze 1,4% a 4,4%.

Pokud se tento trend potvrdí v dalších studiích, měly by být ozřejmeny příčiny tohoto příznivého vývoje. Z mnoha zkoumaných faktorů, které ovlivňují riziko replikace BKV, přicházejí v úvahu zejména změny v cílových hladinách dlouhodobé imunosupresivní terapie a ústup od dlouhodobého podávání kortikoidů.

Porovnáním stupně IS v jednotlivých centrech se ukazují rozdíly v intenzitě dlouhodobé IS terapie a cílových hladinách IS preparátů; ve studii University of Tennessee transplant center (136) bylo riziko vzniku BKNV signifikantně vyšší u SPK příjemců ve srovnání s pacienty po transplantaci ledviny (7,5% vs. 1%). Signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami byl i v cílových hladinách IS preparátů, kdy u SPK příjemců byly cca. o 1/3 vyšší než u příjemců samotné ledviny.

V obou centrech, která popisovala vyšší výskyt BKNV byla používána trojkombinace IS preparátů, která zahrnovala steroidy (135) (136) nebo sirolimus (135). Dadhania et al. (148) ve své studii prokázal, že k nezávidlým rizikovým faktorům vzniku BKNV u příjemců ledviny patří indukční léčba ATG a dlouhodobé podávání kortikoidů. Zajímavým výsledkem bylo, že i v případě podání ATG při časném vysazení kortikoidů riziko BKV replikace podstatně kleslo.

Dávka kortikoidů (konkrétně Prednisonu) se při analýze retrospektivních studií také ukázala být rizikovým faktorem BKNV u příjemců ledviny (102).

Kortikoidy nebyly v dlouhodobém IS režimu vůbec podávány v období nízké incidence BKNV popisované ve studii University of Pittsburgh Medical Center (133) ani ve studii Ison et al. (137). Role

kortikoidů jako významného rizikového faktoru vzniku BKVN se zdá být podporována i nízkou prevalencí BKV positivity v našem centru, kdy ve druhém i třetím období dlouhodobé IS terapie bylo úhelným kamenem časně vysazení kortikoidů (do 6 měsíců a poté i do 6 týdnů od SPK).

U SPK příjemců chybí porovnání jednotlivých IS preparátů s ohledem na riziko BKV replikace. Výsledky publikované pro populaci pacientů po transplantaci ledviny ukazují, že podávání jednotlivých IS preparátů není signifikantně asociováno s vyšším rizikem BKV replikace ani BKVN, ale kombinace tacrolimu a MMF je již významně rizikovější oproti kombinaci CyA a MMF (149) (150) (151). K podobným výsledkům dospěla i randomizovaná studie Brennan et al. (81), kde virurie byla nejvyšší u pacientů léčených kombinací Tac/MMF a nejnižší u těch léčených CyA-MMF.

Léčba tacrolimem byla rovněž signifikantním rizikovým faktorem pozitivní BK-virurie i BK-virémie v longitudinální prospektivní studii *Bressollette-Bodin et al.* (83) a také rizikovým faktorem biopticky verifikované BKVN ve studii *Manitpisitkul et al.* (102) a Mengel et al. (152).

Dadhania et al. (148) nicméně neprokázal žádný rozdíl míry rizika BKV replikace v dávkování ani v cílových hladinách u BKV-pozitivních vs. BKV-negativních pacientů. V naší studii nebylo podávání tacrolimu v iniciálním ani dlouhodobém IS režimu asociováno se signifikantně vyšším rizikem BKV replikace v porovnání s CyA. Tato pozorování ukazují, že dlouhodobé cílové hladiny IS ovlivňují podstatněji riziko BKV replikace a BKVN u SPK příjemců než volba jednotlivých IS preparátů s výjimkou steroidů.

Přestože výše diskutované rozdíly v imunosupresivní terapii mohou být hlavními důvody nízké prevalence pozitivní BKV replikace a BKVN v porovnání s daty získanými od pacientů po transplantaci samotné ledviny (144) (147) (153), musejí být brány v úvahu i jiné faktory, které mohou intenzitu replikace BKV ovlivnit. Patří k nim i fakt, že naše studie měla průřezový (a ne longitudinální) design, což může vest k podhodnocení četnosti výskytu transientní positivity. Graf 3 také ukazuje, že signifikantní počet našich pacientů byl vyšetřován v době, kdy už se nacházel mimo období nejvyššího rizika (0-2 roky od SPK) (80). Nicméně, nízký věk dárců (154) a velmi krátká doba studené ischemie (83) u našich SPK příjemců mohli rovněž sehrát roli v nízké četnosti BKV infekce, neboť více než 80% dárců bylo ve věkové kategorii 12-17 a 18-35 let, t.j. s nejnižším odds ratio rizika léčby pro BKVN ve studii publikované Schold et al. (154), která byla postavena na zhodnocení dat z US Scientific Registry of Transplant Recipients.

Ze dvou klinických faktorů (trvání diabetu a trvání dialýzy před transplantací) asociovaných v naší studii v univariantské analýze s vyšším rizikem replikace BKV vyšel po provedení multivariantského

testování pouze "trvání diabetu před SPK" jako nezávislý rizikový faktor. Pokud bychom mohli spekulovat o významu tohoto zjištění, jednalo by velmi pravděpodobně o dlouhodobě negativní působení diabetu na metabolismus a funkce imunitního systému. Diabetes mellitus vyšel jako nezávislý faktor BKNV v některých studiích, které se zabývaly analýzou rizikových faktorů (136), zdaleka ne všechny práce však tento závěr potvrzují (147).

Z dalších klinických parametrů souvisejících s provedením transplantace vyšel v multivariantní analýze jako nezávislý rizikový faktor BKNV replikace opožděný nástup funkce štěpu ledviny (déle než 3 dny), což zřejmě reflektuje potenciálně permissivní prostředí pro replikaci BKNV v terénu ischemicko-reperfuzního poškození štěpu. Podobné vysvětlení bylo nabízeno v dřívějších pracích pro asociaci BKNV s vyšším počtem HLA neshod nebo předchozích epizod akutní rejekce a antirejekční terapie (80). V naší studii jsme nicméně neprokázali vztah BKNV positivity a trvání studené ischemie, což nejspíše souvisí s celkově krátkou dobou studené ischemie u většiny našich SPK příjemců ve srovnání s jinými centry (83).

Časná diagnostika BKNV infekce je klíčová pro úspěšnou léčbu, která spočívá převážně ve včasné redukci dávek IS terapie. Ke splnění tohoto požadavku je nutné provádění pravidelných screeningových vyšetření BKNV replikace, jako např. cytologie moči (na přítomnost decoy buněk) nebo vyšetření virurie, popřípadě méně rozšířené vyšetření množství VP-1 mRNA v moči, navržené Hirschem et al. (80) pro všechny pacienty po transplantaci ledviny. Optimální screeningové procedury, klinicky relevantní práh počtu kopií BKNV-DNA popř. decoy buněk nebo VP-1 mRNA nutné ke včasné a ekonomicky efektivní diagnostice BKNV infekce stejně jako intervaly vyšetření je nutné teprve stanovit na základě výsledků prospektivních randomizovaných studií.

Z již publikovaných studií však jasně vyplývá, že kvantitativní PCR vyšetření plasmy a/nebo moči svou senzitivitou i prediktivní hodnotou převyšují cytologické vyšetření moči (144). V případě SPK příjemců musíme u pacientů, kteří mají drenáž exokrinního vývodu pankreatu na močový měchýř, brát v úvahu ještě další úskalí cytologického vyšetření moči (138).

Vzhledem k poznatku, že virurie předchází o několik týdnů vzniku virémie i biopticky prokazatelné BKNV (76) se zdá být právě BK-virurie nejlepším screeningovým testem, i když senzitivita i specifita BK-virémie je podstatně vyšší (79) (80).

V ideálním případě by se mělo začít se screeningem již v časném období po transplantaci, neboť aktivní BKNV infekce se objevila během prvních 3 měsíců u 80% pacientů s prokázanou BKNV IgG pozitivitou

(83) a poté opakovat vyšetření každý měsíc během prvních 6 měsíců. Při vyšetřování každé 3 měsíce může totiž dojít k promeškání vzniku některých případů BKN (155).

Dle recentní prospektivní studie (153) detekce pozitivní BK-virurie ve dvou nebo více po sobě následujících vzorcích (persistentní BK-virurie) byla asociována se signifikantně vyššími hladinami BKV DNA v moči a měla také podstatně vyšší specifitu a pozitivní prediktivní hodnotu pro pozitivní BK-virémii a BKN než pozitivita pouze jednoho vzorku (transientní BK-virurie). Pouze persistentní BK-virurie by se tak mohla stát spolehlivým ukazatelem, který by umožnil časné odhalení pacientů s vysokým rizikem vzniku BKN. Přestože jsme neprováděli systematický screening BKV replikace v naší SPK populaci, zdají se být i takto získaná data konsistentní s tímto poznatkem. U žádného z 22 pacientů, u kterých byla prokázána hraniční BK-virurie v iniciační studii nedošlo k progresi virurie ani virémie během doby sledování. Průkaz transientní nízké pozitivní BK-virurie proto velmi pravděpodobně neimplikuje nutnost dalšího invazivního vyšetřování nebo dokonce zásahu do imunosupresivní terapie. Naše výsledky také mohou poukazovat na vyšší výtěžnost a úsporu prostředků, pokud bychom založili screening spíše na testování BK-virémie.

5.6 Shrnutí

Tato studie je jedna z mála, která prospektivním způsobem analyzuje četnost BK-virurie a virémie u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu v jednom transplantačním centru. Prevalence (resp. "point – prevalence") vysoce pozitivní BK-virurie, virémie ("presumptive BKN") a bioticky prokázané BKN byly velmi nízké. Jako nezávislé rizikové faktory BKV replikace byly pomocí multivariantní analýzy identifikovány dva parametry, a to trvání diabetu mellitu prvního typu před transplantací a opožděný nástup funkce štěpu ledviny.

6 Studie 3

Retransplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKVN: efektivní terapeutický postup u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK).

6.1 Úvod a hypotéza

BKVN postihuje 1-10% pacientů po transplantaci ledviny (80) a patří mezi hlavní příčiny ztráty funkce štěpu. Vzhledem k tomu, že zatím stále chybí specifická léčba, hlavním terapeutickým přístupem zůstává včasná redukce dávek imunosupresivních preparátů. Mnoho případů BKVN je diagnostikováno až v pokročilém stádiu, kdy se již manifestuje dysfunkce štěpu (stádium B dle Drachenbergové (94) s difúzním postižením inteticia). Zlepšení této situace je možné pouze zavedením pravidelného skrínigového testování, neboť při pokročilém postižení štěpu (BKVN stádium B) dochází i přes léčbu v minimálně 50% k selhání štěpu, při průkazu stadia C (tubulární atrofie a intersticiální fibróza) selhává dokonce až 90% štěpů (156).

Retransplantace ledviny (reTx) po selhání na podkladě BKVN se nabízí jako metoda volby, nicméně vzhledem k nízkým počtům těchto pacientů v jednotlivých centrech je publikováno o této populační skupině velmi málo údajů a některé otázky týkající se této specifické problematiky zůstávají nezodpovězeny (129) (157).

K hlavním problémům patří zejména otázky, zda je nutné provést pre-emptivní nefrektomii před plánovanou reTx a nebo spíše dočasně redukovat dávku IS terapie za účelem snížení replikace BKV a odstranění možného zdroje infekce pro nový štěp, či zda je nutné po reTx upravit IS léčbu. Tyto otázky jsou ještě naléhavější v případě SPK příjemců, kde při zachované funkci štěpu pankreatu nepřipadá v úvahu výraznější redukce IS po selhání ledviny.

Jak je již diskutováno ve studii 2, o průběhu BKV infekce a BKVN bylo až doposud publikováno velmi omezené množství informací. O reTx ledviny u SPK příjemců je dostupných informací ještě daleko méně, většinou se jedná o retrospektivní analýzy charakteru kazuistik (129) (130) (158).

Cílem naší práce bylo popsat zkušenosti našeho centra s reTx ledviny po slehání funkce na podkladě BKVN u čtyř SPK příjemců.

6.2 Metodika

Provedli jsme retrospektivní zhodnocení pěti případů retransplantace ledviny (reTx) u čtyř pacientů s diabetem mellitem 1. typu (M/Ž 2/2, věk medián (rozsah) 36 (27-52) let, trvání diabetu 22 (17-26) let), kteří podstoupili SPK v IKEM v období 1999-2002.

Demografické a klinické charakteristiky první transplantace a reTx jsou shrnuty v tabulkách 9 a 10.

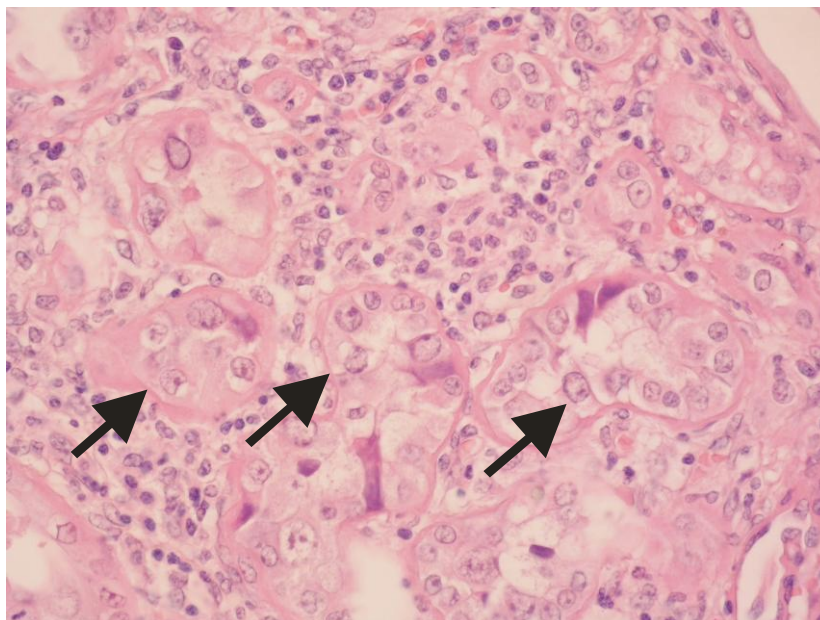
6.3 Výsledky

BKVN byla biopticky verifikována 20 (8-22) měsíců od SPK a ve většině případů byla diagnostikována ve stádiu B (156) (Obr. 12). I přes úpravy IS terapie u všech pacientů (tj. snížení dávky, vysazení MMF a převod pacienta na terapii sirolimem v jednom případě a přechod z CyA na azathioprin u dalšího pacienta) a podávání cidofoviru u jednoho pacienta (40 mg - 0,54mg/kg každé 2 týdny), došlo u všech pacientů k selhání štěpu za 29 (23-39) měsíců po SPK a 13 (1-23) měsíců od potvrzení diagnózy BKVN.

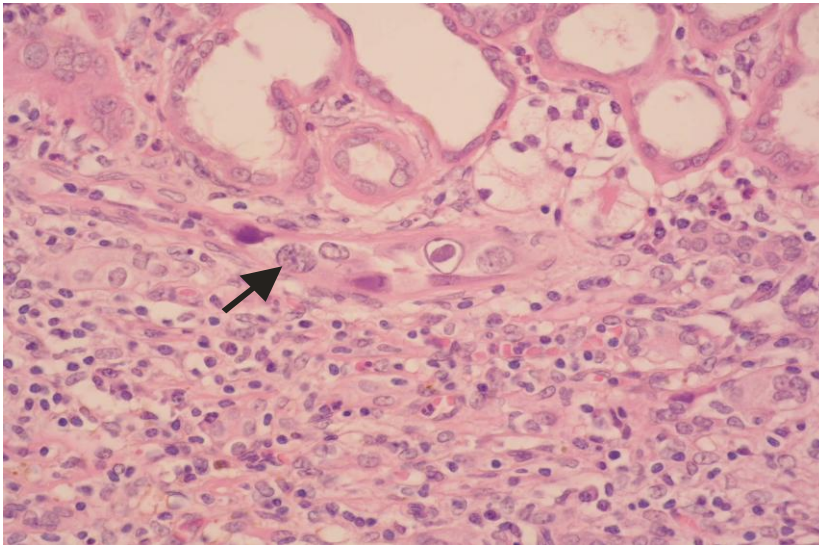
Po celou dobu klinického sledování nebylo zaznamenáno zhoršení funkce štěpu pankreatu a všichni pacienti zůstali nezávislí na inzulínu.

Obr. 12. BKVN stádium B dle (156) přítomné v době potvrzení diagnózy u většiny našich pacientů

A



B



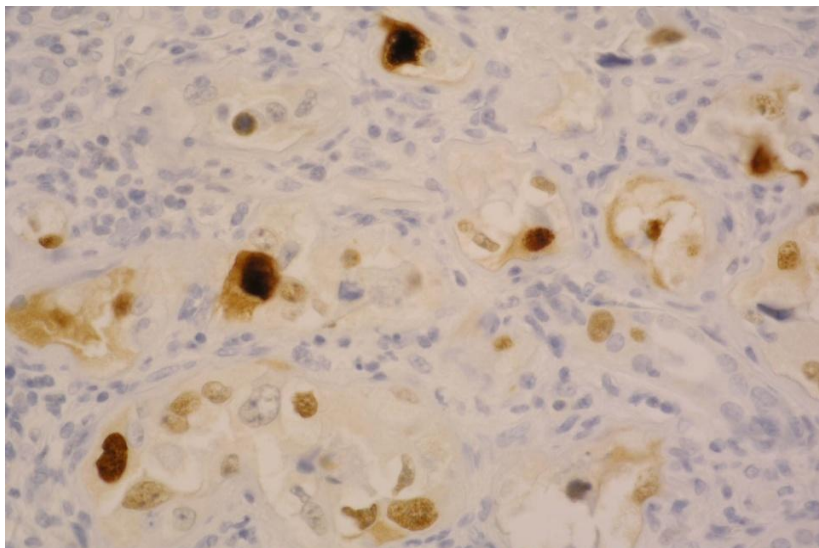
A – Tubulární epitelie s intranukleárními virovými inkluzemi (označené šipkami)

B - Intranukleární virové inkluze (označené šipkou) a dominující difúzní intersticiální zánětlivý infiltrát

A+B – Základní barvení hematoxylin-eozinem

C - Imunohistochemický průkaz viru protilátkou proti SV40T antigenu

C



(Voska L.: Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM)

Všichni pacienti podstoupili reTx ledviny 36 (27-63) měsíců od SPK. Pacienti 1 a 4 byli retransplantováni před zahájením dialyzační terapie a graftektomie byla provedena až v jedné době s reTx. U pacientů 2 a 3 byla provedena pre-emptivní nefrektomie a byli dialyzováni 9 a 18 měsíců před reTx.

U pacienta 1 BKNV rekurovala 6 měsíců a k selhání nového štěpu došlo 1 rok po první reTx i přes změnu IS terapie (redukce dávky tacrolimu, převod z MMF na sirolimus, vysazení prednisonu). Po selhání byla provedena pre-emptivní nefrektomie druhého štěpu, pacient byl dialyzován a až po určité době byla provedena druhá reTx (tabulka 9).

Tabulka 9. Demografické a klinické charakteristiky SPK pacientů s BKNV

Pacient č.	Pohlaví	Trvání diabetu (roky)	Věk v době SPK(roky)	Iniciální IS	Antirejektivní terapie	Doba od SPK do diagnózy BKNV (měs.)	Stádium BKNV v době diagnózy	Léčba BKNV	Doba od diagnózy BKNV do selhání štěpu nebo reTx(měs)	Trvání dialyzační léčby (měs)	Preemptivní NE (měs. před reTx)	Doba do reTx (měs.)
1 (SPK)	M	21	35	Tac, MMF	3.75g MP	21	B	Red IS	6	0	0	27
1 (první reTx)	-	-	-	Tac, MMF, Prednison	1.5g MP	6	B	Převod MMF/ Siro, Red Tac, vysazení Prednisonu	6	25	15	37
2	Ž	23	52	Tac, Siro	0	22	A	Red IS	1	17	9	40
3	M	26	37	CyA, MMF	0.5g MP, 1.8g ATG	20	B	Převod MMF/ Siro, CyA/Aza, Aza/Prednison	19	24	18	63
4	Ž	17	27	Tac, MMF	0	8	B	Red IS	23	0	0	31
medián (rozsah)		22(17-26)	36(27-52)			21(8-22)*			13(1-23)*			36(27-63)*

MP: methylprednisolon, ATG: antithymocytární globulin,

Tac: tacrolimus, MMF: mykofenolát mofetil, CyA: cyklosporin A, Aza: azathioprine, Siro: sirolimus, IS: imunoprese, Red: redukce, NE: nefrektomie, reTx: retransplantace ledviny, měs.: měsíce

* Období po první reTx u pacienta 1 není uvedeno

Všichni pacienti byli k datu 30/09/2007 nezávislí na inzulinu a bez potřeby dialyzační léčby. Klinické a laboratorní charakteristiky pacientů po reTx jsou shrnuty v tabulce 10. Doba sledování je 30 (9-55) měsíců od poslední reTx. Dlouhodobá IS terapie je u většiny pacientů založena na kombinaci tacrolimu/sirolimu; pacient 1 je léčen kombinací CyA/MMF. U pacienta 4 byla zjištěna vysoce pozitivní BK-virurie a nízké pozitivní BK-virémie, ostatní byli BKNV DNA negativní.

Tabulka 10. Klinické a laboratorní parametry po retransplantaci ledviny

Pacient č.	IS po reTx	P-kreatinin (μmol/l) v době studie	BK virémie (kopie/mL)	BK virurie (kopie/mL)	Doba sledování od reTx (més.)
1 (Druhá reTx)	CyA, MMF	140	<10E+03	9,07E+03	39
2	Tac, Siro	128	<10E+03	<10E+03	20
3	Tac, Siro	211*	<10E+03	<10E+03	9
4	Tac, Siro	195	7,60E+03	1,30E+08	55
medián (rozsah)					30 (9-55)

CyA: cyklosporin A, MMF: mykofenolát mofetil, Siro: sirolimus, Tac: tacrolimus

*Opožděný nástup funkce štěpu u pacienta 3 na podkladě akutní tubulární nekrózy

6.4 Diskuse

Po retransplantaci ledviny při selhání funkce štěpu na podkladě BKN je nutné počítat s potenciálním rizikem rekurence. Přestože dle doposud publikovaných údajů nebyla rekurence závažnějším problémem (postihla pouze 2 z 15 pacientů), může být její četnost vyšší než výskyt BKN u pacientů po první transplantaci (157).

Dle konsensu mezinárodního shromáždění expertů (80) by retransplantace neměla proběhnout v období aktivní replikace BKV. Poklesu počtu kopií BKV DNA lze dosáhnout redukcí nebo úplným vysazením IS terapie společně s podáváním antivirotik nebo pre-emptivní ureteronefektomií selhaného štěpu. U SPK příjemců lze s ohledem na funkční štěp pankreatu uvažovat pouze o druhé možnosti, neboť významná redukce či úplné vysazení IS by ohrozilo funkci pankreatu.

Nevýhody a potenciální rizika vyplývající z dalšího chirurgického výkonu jsou vyvažována benefitem pre-emptivní nefrektomie v podobě velmi rychlého poklesu virémie, neboť dle studie Funka et al. (131) dochází po odstranění selhaného štěpu k poklesu BK-virémie v řádu hodin k nulovým hodnotám a tento pokles nezávisí na stupni imunosuprese.

Pokud zvolíme k dosažení poklesu BK-virémie pouze redukcí dávek IS terapie, je v tomto případě nutné dlouhodobé sledování trendu virémie.

Ne všichni však souhlasí s tvrzením, že by se mělo přistoupit k reTx až v období negativní BKV replikace. Womer et al. (130) popsali kazuistiku 2 pacientů (jeden pacient po transplantaci ledviny, druhý byl SPK příjemce) u kterých byla provedena pre-emptivní reTx ledviny od žijícího dárce v době pozitivní BK-virémie. U žádného z nich nedošlo k rekurenci BKN a oba měli 21 a 12 měsíců od reTx

stabilní dobrou funkci ledviny. Dle autorů byl přínos pre-emptivní retransplantace bez nutnosti dialyzační léčby z hlediska dlouhodobé funkce štěpu vyšší než potenciální riziko rekurence. Nižší míra ischemicko-reperfuzního poškození, méně epizod akutní rejekce a vyšší počet shod v HLA systému v případech transplantace ze žijících versus z kadaverozních dárců jsou faktory, které byly rovněž brány do úvahy při posuzování rizika rekurence BKN.

Naše výsledky poskytují v porovnání se sděleními z ostatních center relativně extenzivní zkušenosti doposud publikované, i když doba sledování u jednoho z pacientů je pravděpodobně příliš krátká na to, abychom spolehlivě vyloučili relaps BKN. Vzhledem k nízkému počtu pacientů nelze provést exaktní statistickou analýzu, nicméně ani naše pozorování nepodporuje pre-emptivní retransplantaci v období aktivní BKN replikace. Tento postup selhal u pacienta 1, jehož kazuistika již byla dříve publikována (159), u kterého došlo k relapsu BKN 6 měsíců po pre-emptivní reTx. V druhém případě provedení pre-emptivní reTx (pacient 4) byla u tohoto pacienta v době studie přítomná nízká pozitivní virémie, vysoce pozitivní virurie a zhoršená funkce štěpu (tabulka 10) i když ani v jedné ze dvou biopsií provedených 6 a 30 měsíců po reTx nebyla diagnostikována BKN (v obou případech byly SV40T negativní). Všechny renální štěpy našich příjemců pocházely od zemřelých dárců. Přestože nemáme srovnání se skupinou příjemců štěpů od živých dárců a musíme připustit určité výhody tohoto typu transplantace, výsledky získané v našem centru podporují doporučení pre-emptivní nefrektomie před reTx.

6.5 Shrnutí

Retransplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKN je metodou volby i u SPK příjemců. Přestože stále chybí ověření randomizovanými studiemi a je mnoho okolností, které ovlivňují vznik produktivní BKN infekce ve štěpu, ukazují naše výsledky na nutnost redukce replikační aktivity BKN před retransplantací. Snížení replikační aktivity lze docílit dvěma způsoby; skrze redukci IS terapie a/nebo pre-emptivní ureteronefrektomií selhaného štěpu (158). V případě SPK příjemců je s ohledem na zachovanou funkci štěpu pankreatu ureteronefektomie metodou volby, případná redukce IS musí být provedena velmi opatrně, pokud vůbec. V období retransplantace i po ní by mělo být samozřejmostí pravidelné sledování počtu kopií BKN DNA v plasmě a/nebo v moči, aby byla včas zachycena případná rekurence základního onemocnění.

7 Závěrečné shrnutí

Problematika BKV infekce u pacientů po transplantaci ledviny a pankreatu je doposud málo prozkoumaná, nicméně ani při relativně malém počtu pacientů, u kterých byla v naší studii pozitivita BK viru diagnostikována, není rozhodně zanedbatelná. Včasným terapeutickým zásahem lze totiž zabránit ztrátě funkce ledvinného štěpu při minimálním riziku vzniku akutní rejekce štěpu pankreatu. Po selhání štěpu ledviny na podkladě BKVN je re-transplantace metodou volby.

Přínosem mé práce bylo zavedení diagnostické metody BK virémie v našem centru a ověření její přesnosti, čímž mohly proběhnout následující fáze studie, tj. zjištění prevalence BKV infekce u SPK příjemců, analýza rizikových faktorů a terapeutických přístupů u BKV-pozitivních pacientů.

Vzhledem k přínosu včasné redukce imunosuprese již ve fázi vzestupu BK-virémie nejlépe před rozvojem BKVN jsem rovněž zavedla v našem centru skrínigový program BK-virémie u SPK příjemců, který vychází z doporučení panelu expertů pro příjemce samotné ledviny (80).

Do budoucna se chci věnovat prospektivnímu sledování pacientů s pozitivními výsledky skrínigového vyšetření BK-virémie, optimalizaci terapeutických přístupů při prokázané BKV infekci, hledání nových rizikových faktorů replikace BK viru a v neposlední řadě prognostickým ukazatelům vývoje funkce štěpu u pacientů s již prokázanou BKVN. Bez zajímavosti není ani vztah BKV a jiných oportunních infekcí (CMV, bakteriálních infekcí) a hodnocení rizika replikace BK viru u pacientů po transplantaci jiných orgánů (samotného pankreatu, Langerhansových ostrůvků, samotné ledviny od žijícího dárce (v kombinaci s faktem, že příjemce je diabetik atd.).

8 Použitá literatura

1. **Jiang M, Abend J.R., Johnson S.F., Imperiale M.J.** The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009, 384:266-273.
2. **Hirsch H.H., Steiger J.** Polyomavirus BK. *Lancet infectious diseases* . 2003, 3:611-623.
3. **Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al.** 199(6):837-46. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis.* . 2009, 199(6):837-46.
4. **Chang CY, Gangji A, Chorneyko K, Kapoor A.** Urological manifestations of BK polyomavirus in renal transplant recipients. *Can J Urol*. 2005, 12(5):2829-36.
5. **Dropulic LK, Jones RJ.** Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008, 41(1):11-8.
6. **Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B.** New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971, 19;1(7712):1253-7.
7. **Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P.** BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis.* . 1995, 26(4):671-3.
8. **Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al.** Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation*. 1999, 15;67(1):103-9.
9. **Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, et al.** Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*. 1999, 27;67(6):918-22.
10. **Moens U, Rekvig OP.** Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. [autor knihy] Stoner GL Khalili K. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York : Wiley-Liss, 2001, stránky 215-26.
11. **Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, et al.** The human polyomavirus BK: Potential role in cancer. *J Cell Physiol*. 2005, 204(2):402-6.
12. **Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T.** A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol*. 1994, 68(4):2398-408.
13. **Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, et al.** Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* 2007, 9(2):204-13.
14. **Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P.** Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol*. 2009, 83(5):2285-97.
15. **Tognon M, Corallini A, Martini F, et al.** Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene*. 2003, 22(33):5192-200.

16. **Sapp M, Day PM.** Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*. 2009, 384(2):400-9.
17. **Klug, A.** Structure of Viruses of the Papilloma-Polyoma Type. li. Comments on Other Work. *J Mol Biol*. 1965, 11:424–31.
18. **Neu U, Stehle T, Atwood WJ.** The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*. 2009, 384(2):389-99.
19. **Neu, U., Woellner, K., Gauglitz, G., Stehle, T.** Structural basis of GM1 ganglioside recognition by simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105 (13);5219–5224.
20. **Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ.** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 2006, 80(3):1361-6.
21. **Dugan A, Eash S, Atwood WJ.** An N-linked glycoprotein with alpha (2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK Virus. *J Virol*. 2005, 79:14442–14445.
22. **Dugan AS, Gasparovic ML, Atwood WJ.** Direct Correlation between Sialic Acid Binding and Infection of Cells by Two Human Polyomaviruses (Jcv and Bkv). *J Virol*. 2008, 82(5):2560-4.
23. **Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, et al.** Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*. 2003, 22:4346–4355.
24. **Qian M, Cai D, Verhey J. K, Tsai B.** A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathog*. 2009, 5(6):e1000465.
25. **Varki, A.** Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*. 2008, 14(8):351–60.
26. **Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al.** The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*. 2004, 303(5665):1838–42.
27. **Stehle T, Harrison SC.** High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* . 1997, 16(16):5139–5148.
28. **Swimm AI, Bornmann W, Jiang M, et al.** Abl-family Tyrosine Kinases Regulate Sialylated Ganglioside Receptors for Polyomavirus. *J Virol*. 2010, 84(9):4243-51.
29. **Borissov K, Tsekov I, Gavazova R, Kalvatchev Z, Argirova R.** Do human polyoma viruses and human immunodeficiency virus share common co-receptors? *J Med Virol*. 2010, 82(1):8-13.
30. **Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, et al.** ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell*. 2005, 20; 289–300.
31. **Rainey-Barger EK, Magnuson B, Tsai B.** A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J Virol*. 2007, 81;12996–13004.
32. **Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C, et al.** Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2003, 14;4783–4793.

33. **Ashok A, Atwood WJ.** Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol.* 2003, 77:1347–1356.
34. **Eash S, Atwood WJ.** Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol.* 2005, 79:11734–11741.
35. **Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A.** Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 2001, 3:473–483.
36. **Pelkmans L, Puntener D, Helenius A.** Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002, 296:535–539.
37. **Hebert DN, Molinari M.** In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007, 87(4):1377–408.
38. **Ishii N, Minami N, Chen EY, et al.** Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J Virol.* 1996, 70(2):1317–22.
39. **Kasamatsu H, Nakanishi A.** How do animal DNA viruses get to the nucleus? . *Annu Rev Microbiol.* 1998, 52:627–86.
40. **Yamada M, Kasamatsu H.** Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *J Virol.* 1993, 67(1):119–30.
41. **Doerries, K.** Human polyomavirus JC and BK persistent infection. [autor knihy] Ashan N. *Polyomaviruses and human diseases.* New York : Springer Science + Business Media, 2006, stránky 102-114.
42. **Lufino MP, Edser PA, Wade-Martins R.** Advances in High-capacity Extrachromosomal Vector Technology: Episomal Maintenance, Vector Delivery, and Transgene Expression. *Mol Ther.* 2008, 16(9):1525-38.
43. **Milanesi G, Barbanti-Brodano G, Negrini M. et al.** BK virus-plasmid expression vector that persists episomally in human cells and shuttles into Escherichia coli. *Mol Cell Biol.* 1984, 4:1551–1560.
44. **Tavalai N, Stamminger T.** New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 1783(11):2207-21.
45. **Butin-Israeli V, Drayman N, Oppenheim A.** Simian virus 40 infection triggers a balanced network that includes apoptotic, survival, and stress pathways. *J Virol.* 2010, 84(7):3431-42.
46. **Wright CM, Seguin SP, Fewell SW, et al.** Inhibition of Simian Virus 40 replication by targeting the molecular chaperone function and ATPase activity of T antigen. *Virus Res.* 2009, 141(1):71-80.
47. **Mastrangelo IA, Hough PV, Wall JS, Dodson M, Dean FB, Hurwitz J.** ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature.* 1989, 338(6217):658–662.

48. **Li D, Zhao R, Lilyestrom W, et al.** Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*. 2003, 423(6939):512–518.
49. **Jiang X, Klimovich V, Arunkumar AI, et al.** Structural mechanism of RPA loading on DNA during activation of a simple prereplication complex. *EMBO J*. 2006, 25(23):5516–5526.
50. **Maga G, Stucki M, Spadari S, Hubscher U.** DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J. Mol. Biol.* 2000, 295(4):791–801.
51. **Mossi R, Keller RC, Ferrari E, Hubscher U.** DNA polymerase switching: II. Replication factor C abrogates primer synthesis by DNA polymerase alpha at a critical length. *J. Mol. Biol.* 2000, 295(4):803–814.
52. **Smelkova NV, Borowiec JA.** Dimerization of simian virus 40 T-antigen hexamers activates T-antigen DNA helicase activity. *J. Virol.* 1997, 71(11):8766–8773.
53. **Kim HY, Ahn BY, Cho Y.** Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. *EMBO J*. 2001, 20(1–2):295–304.
54. **Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A.** The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2006, 156:1–21.
55. **Fewell SW, Pipas JM, Brodsky JL.** Mutagenesis of a functional chimeric gene in yeast identifies mutations in the simian virus 40 large T antigen J domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002, 99(4):2002–2007.
56. **Srinivasan A, McClellan AJ, Vartikar J, et al.** The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17(8):4761–4773.
57. **Chromy LR, Oltman A, Estes PA, Garcea RL.** Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma and papillomaviruses. *J. Virol.* 2006, 80(10):5086–509.
58. **Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL.** In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 1995, 69(12):7807–7813.
59. **Bird G, O'Donnell M, Moroianu J, Garcea RL.** Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol.* 2008, 82(20):9848–57.
60. **Fraenkel-Conrat H, Williams RC.** Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1955, 41, 690–698.
61. **Chuan YP, Fan YY, Lua LH, Middelberg AP.** Virus assembly occurs following a pH- or Ca²⁺-triggered switch in the thermodynamic attraction between structural protein capsomeres. *J R Soc Interface*. 2010, 7(44):409–21.
62. **Coca-Prados M, Hsu MT.** Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. II. Biochemical and electron microscopic analysis of simian virus 40 virion assembly. *J Virol.* 1979, 31:199–208.

63. **Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL.** Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003, 100:10477–10482.
64. **Clever J, Dean D, Kasamatsu H.** Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins VP2 and VP3. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:20877–20883.
65. **Li PP, Nakanishi A, Shum D, et al.** Simian virus 40 Vp1 DNA-binding domain is functionally separable from the overlapping nuclear localization signal and is required for effective virion formation and full viability. *J Virol.* 2001, 75:7321-7329.
66. **Dalyot-Herman N, Ben-nun-Shaul O, Gordon-Shaag A, Oppenheim A.** The simian virus 40 packaging signal ses is composed of redundant DNA elements which are partly interchangeable. *J Mol Biol.* 1996, 259(1):69-80.
67. **Oppenheim A, Sandalon Z, Peleg A, Shaul O, Nicolis S, Ottolenghi S.** A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J. Virol.* 1992, 66: 5320–5328.
68. **Gidoni D, Dynan WS, Tjian R.** Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature.* 1984, 312:409–413.
69. **Gordon-Shaag A, Ben-Nun-Shaul O, Kasamatsu H, Oppenheim AB, Oppenheim A.** The SV40 capsid protein VP3 cooperates with the cellular transcription factor Sp1 in DNA-binding and in regulating viral promoter activity. *J. Mol. Biol.* 1998, 275:187-195.
70. **Coca-Prados M, Yu HY, Hsu MT.** Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. IV. Micrococcal nuclease digestion. *J. Virol.* 1982, 44:603-609.
71. **Roitman-Shemer V, Stokrova J, Forstova J, Oppenheim A.** Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 353:424-430.
72. **Oppenheim A., Ben-nun-Shaul O., Mukherjee S, Abd-El-Latif M.** SV40 assembly in vivo and in vitro. *Computational and Mathematical Methods in Medicine.* 2008, 9(3-4):265–276.
73. **Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN.** A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog.* 2007, 3(7):e98.
74. **Comoli P, Azzi A, Maccario R, et al.** Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation.* 2004, 78(8):1229-32.
75. **Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al.** Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007, 7(5):1131-9.
76. **Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al.** Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002, 347(7):488-96.
77. **Hariharan, S.** BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int.* 2006, 69(4):655-62.

78. **Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, et al.** BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005, 68(4):1834-9.
79. **Polyomavirus Nephropathy: A Current Perspective and Clinical Considerations. Wiseman, AC.** 54(1):131-42, 2009.
80. **Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al.** Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005, 79(10):1277-86.
81. **Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al.** Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 2005, 5(3):582-94.
82. **Prince O., Savic S., Dickenmann M., et al.** Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2009, 24:1024–1033.
83. **Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, et al.** A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005, 5(8):1926-33.
84. **Fogazzi GB, Cantú M, Saglimbeni L.** 'Decoy cells' in the urine due to polyomavirus BK infection: easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol Dial Transplant.* 2001, 16: 1496-1498.
85. TRI REAGENT® - RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT. *Product description and Protocol.* [Online] 01. Sep 2010. [Citace: 17. Nov 2010.] <http://www.mrcgene.com/tri.htm>.
86. **Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C.** Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.* 2004, 26: 133–46.
87. **Vandesompele, J.** *qPCR guide.* [Online] [Citace: 17. Nov 2010.] <http://www.eurogentec.com/uploads/GRT-QQPCR-BOOKLET-0604-V2.pdf>.
88. **M.W., Pfaffl.** Real-time PCR. *The real-time PCR Encyclopaedia A-Z of quantitative PCR.* La Jolla : International University Line, 2004, stránky 82-85.
89. **Pfaffl, MW.** Quantification strategies in real-time PCR. [autor knihy] Pfaffl M.W. *The real-time PCR Encyclopaedia A-Z of quantitative PCR.* La Jolla : International University Line, 2004, stránky 87-120.
90. **Affigene.** Affigene user's guide. *Affigene BKV trender.* 2008. verze 25.
91. **Burns M., Valdivia C.H.** Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur Food Res Technol.* 2008, 226:1513–1524.
92. **Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR.** Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(8):2671-80.

93. **Honsová E, Lodererová A, Lácha J, Voska L, Housa D, Bouček P.** Aktuality v nefrologii. *Polyomavirová infekce ledviných štěpů (BK virus nefropatie)*. [Online] 01. 03 2003. [Citace: 20. 11 2010.] www.tigis.cz/AVN/AVN303/06.htm. 9(3).
94. **Drachenberg CB, Papadimitriou JC.** Polyomavirus-associated nephropathy: update in diagnosis. *Transpl Infect Dis*. 2006, 8(2):68-75.
95. **Sis B, Mengel M, Haas M, et al.** Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010, 10(3):464-71.
96. **Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH.** The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation*. 2009, 87(5):621-30.
97. **Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E.** Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol*. 2006, 577:160-73.
98. **Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al.** Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation*. 2002, 74(7):987-94.
99. **Dadhania D, Snopkowski C, Ding R, et al.** Validation of noninvasive diagnosis of BK virus nephropathy and identification of prognostic biomarkers. *Transplantation*. 2010, 90(2):189-97.
100. **Li YJ, Weng CH, Lai WC, et al.** A suppressive effect of cyclosporine A on replication and noncoding control region activation of polyomavirus BK virus. *Transplantation*. 2010, 89(3):299-306.
101. **Egli A, Köhli S, Dickenmann M, Hirsch HH.** Inhibition of polyomavirus BK-specific T-Cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation*. 2009, 88(10):1161-8.
102. **Manitpisitkul W, Drachenberg C, Ramos E.** Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. *Transplantation*. 2009, 88(1):83-8.
103. **Batal I, Franco ZM, Shapiro R, et al.** Clinicopathologic analysis of patients with BK viruria and rejection-like graft dysfunction. *Hum Pathol*. 2009, 40(9):1312-9.
104. **Andrei G, Snoeck R, Vandeputte R et al.** Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997, 41: 87–593.
105. **Josephson MA, Gillen D, Javaid B et al.** Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation*. 2006, 81: 704–10.
106. **Puliyanda D, Radha RK, Amet N et al.** IVIG contains antibodies reactive with polyoma BK virus and may represent a therapeutic option for BK nephropathy. *Am J Transplant*. 2003, 3: 393.
107. **Ali SH, Chandraker A, DeCaprio JA.** Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antivir Ther*. 2007, 12: 1–6.
108. **Deval, J.** Antimicrobial strategies: inhibition of viral polymerases by 3'-hydroxyl nucleosides. *Drugs*. 2009, 69(2):151-66.

109. **Ortiz A., Justo P., Sanz A., et al.** Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute renal failure. *Antivir Ther.* 2005, 10(1):185-90.
110. **Cundy K.C., Li Z.H., Lee W.A.** Effect of probenecid on the distribution, metabolism, and excretion of cidofovir in rabbits. *Drug Metab Dispos.* 1996, 24(3):315-21.
111. **Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH.** Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant.* 2008, 8(7):1413-22.
112. **Pallet N, Burgard M, Quamouss O, et al.** Cidofovir may be deleterious in BK virus-associated nephropathy. *Transplantation.* 2010, 89(12):1542-4.
113. **Hilton R, Tong C.Y.W.** Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008, 62;855–859.
114. **Štolfa, J.** Leflunomid v léčbě psoriatické artritidy. *Farmakoterapie.* 2006, 343(1):109-115.
115. **Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ.** Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol.* 2010, 84(4):2150-6.
116. **Suchý, D.** Revmatoidní artritida – diagnóza a léčba. *Interní medicína pro praxi.* 2003, 7;342-347.
117. **Leca N, Pichler R, Kowalewska J et al.** Leflunomide use in renal transplantation. Is it causing hemolytic syndrome? *Am J Transplant.* 2007, 7:265.
118. **PS, Randhawa.** Anti-BK virus activity of ciprofloxacin and related antibiotics. *Clin Infect Dis.* 2005, 41(9):1366-7.
119. **Leung AY, Chan MT, Yuen KY.** Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005, 40(4):528-37.
120. **Chandraker A, Ali S, Drachenberg CB, et al.** Use of fluoroquinolones to treat BK infection in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004, 4:587.
121. **Thamboo TP, Jeffery KJ, Friend PJ et al.** Urine cytology screening for polyoma virus infection following renal transplantation: the Oxford experience. *J Clin Pathol.* 2007, 60:927–30.
122. **Wadei HM, Rule AD, Lewin M, et al.** Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant.* 2006, 6(5 Pt 1):1025-32.
123. **Halim MA, Al-Otaibi T, El-Kholy O, et al.** Active management of post-renal transplantation BK virus nephropathy: preliminary report. *Transplant Proc.* 2009, 41(7):2850-2.
124. **Johnston O, Jaswal D, Gill JS, et al.** Treatment of Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients: A Systematic Review. *Transplantation.* 2010, 89(9):1057-70.

125. **Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al.** Prospective Monitoring of Polyomavirus BK Replication and Impact of Pre-Emptive Intervention in Pediatric Kidney Recipients. *Am J Transplant.* 2007, 7(12):2727-35.
126. **Randhawa P, Brennan DC.** BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *Am J Transplant.* 2006, 6(9):2000-5.
127. **Kiberd, BA.** Screening to prevent polyoma virus nephropathy: A medical decision analysis. *Am J Transplant.* 2005, 5:2410–2416.
128. **Smith F, Panek R, Kiberd BA.** Screening to prevent polyoma virus nephropathy in kidney transplantation: a cost analysis. *Am J Transplant.* 2009, 9(9):2177-9.
129. **Ramos E, Vincenti F, Lu WX, et al.** Retransplantation in patients with graft loss caused by polyoma virus nephropathy. *Transplantation.* 2004, 77:131.
130. **Womer KL, Meier-Kriesche HU, Patton PR, et al.** Preemptive retransplantation for BK virus nephropathy: successful outcome despite active viremia. *Am J Transplant.* 2006, 6(1):209-13.
131. **Funk GA, Steiger J, Hirsch HH.** Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2006, 193(1):80-7.
132. **Kasiske BL, Snyder JJ, Matas AJ, et al.** Preemptive kidney transplantation: The advantage and the advantaged. *JAmSoc Nephrol.* 2002, 13(5):1358.
133. **Gupta G, Shapiro R, Thai N, et al.** Low incidence of BK virus nephropathy after simultaneous kidney pancreas transplantation. *Transplantation.* 2006, 82:382.
134. **Razonable RR, Brown RA, Humar A, et al.** A longitudinal molecular surveillance study of human polyomavirus viremia in heart, kidney, liver, and pancreas transplant patients. *J Infect Dis.* 2005, 192(8):1349-54.
135. **Lipshutz GS, Mahanty H, Feng S, et al.** BKV in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients: A leading cause of renal graft loss in first 2 years post-transplant. *Am J Transplant.* 2005, 5:366.
136. **Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, et al.** Polyomavirus in kidney and kidney/pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2003, 5:21.
137. **Ison MG, Parker M, Stosor V, Kaufman DB.** Development of BK nephropathy in recipients of simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation.* 2009, 87(4):525-30.
138. **Lard LR, van der Boog PJ, Veselic M, et al.** A pitfall in screening with decoy cells after simultaneous pancreas kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2008, 22(6):833-6.
139. **Hirsch H.H., Mohaupt M, Klimkait T.** Prospective Monitoring of BK Virus Load after Discontinuing Sirolimus Treatment in a Renal Transplant Patient with BK Virus Nephropathy. *J Infect Dis.* 2001, 184:1497–8.

140. **Deback C, Géli J, Aït-Arkoub Z, Angleraud F, Gautheret-Dejean A, Agut H, Boutolleau D.** Use of the Roche LightCycler® 480 system in a routine laboratory setting for molecular diagnosis of opportunistic viral infections: Evaluation on whole blood specimens and proficiency panels. *J Virol Methods*. 2009, 159(2):291-4.
141. **Gracia-Ahufinger I, Tormo N, Espigado I, et al.** Differences in cytomegalovirus plasma viral loads measured in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients using two commercial real-time PCR assays. *J Clin Virol*. 2010, 48(2):142-6.
142. **Bonvoisin C, Weekers L, Xhignesse P, et al.** Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation*. 2008, 85(7 Suppl):S42-8.
143. **Nickeleit V, Mihatsch MJ.** Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transplant Int*. 2006, 19:960.
144. **Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al.** Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation*. 2007, 84:340.
145. **Saudek F, Malaise J, Boucek P, Adamec M, EUROSPK Study Group.** Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in primary SPK transplantation: 3-year results of the Euro-SPK 001 trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2005, 20 (Suppl 2):3.
146. **Margreiter R, Malaise J, Pratschke J, et al.** Sirolimus versus mycophenolate mofetil in tacrolimus based primary simultaneous pancreas-kidney (SPK) transplantation: 6-months results of a multicenter trial. *Am J Transplant*. 2006, 6 (Suppl 2):105.
147. **Yeo FE, Yuan CM, Swanson SJ, et al.** The prevalence of BK polyomavirus infection in outpatient kidney transplant recipients followed in a single center. *Clin Transplant*. 2008, 22:532.
148. **Dadhanian D, Snopkowski C, Ding R, et al.** Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation*. 2008, 86:521.
149. **Hirsch HH, Friman S, Wiecek A, Rostaing L, Pescovitz M.** Prospective study of polyomavirus BK viruria and viremia in de novo renal transplantation (Abstract #77). *Am J Transplant 2007*. 2007, 7 (Suppl.5):150.
150. **Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC.** An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation*. 2009, 87(7):1019.
151. **White LH, Casian A, Hilton R, et al.** BK virus nephropathy in renal transplant patients in London. *Transplantation*. 2008, 85(7):100.
152. **Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al.** Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant*. 2003, 18(6):1190.
153. **Babel N, Fendt J, Karaivanov S, et al.** Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation*. 2009, 88:89.

154. **Schold JD, Rehman S, Kayle LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU.** Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transpl Int.* 2009, 22: 626.
155. **Almeras C, Foulongne V, Guarrigue V, et al.** Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation.* 2008, 85:1099.
156. **Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al.** Histological patterns of polyomavirus nephropathy: Correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant.* 2004, 4:2082–2092.
157. **Hirsch HH, Ramos E.** Retransplantation after polyomavirus-associated nephropathy: Just do it? *Am J Transplant.* 2006, 6:7–9.
158. **Al Jedai AH, Honaker MR, Trofe J, et al.** Renal allograft loss as the result of polyomavirus interstitial nephritis after simultaneous kidney-pancreas transplantation: Results with kidney retransplantation. *Transplantation.* 2003, 75:490–494.
159. **Boucek P, Voska L, Saudek F.** Successful retransplantation after renal allograft loss to polyoma virus interstitial nephritis. *Transplantation.* 2002, 74:1478.
160. **Boutolleau D, Deback C, Géli J, et al.** Use of the Roche LightCycler® 480 system in a routine laboratory setting for molecular diagnosis of opportunistic viral infections: Evaluation on whole blood specimens and proficiency panels. *J Virol Methods.* 2009, 159(2):291-4.

9 Vlastní publikační aktivita

9.1 Publikace týkající se tématu dizertační práce

9.1.1 Články

1. **Mindlova M**, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. **Kidney retransplantation following graft loss to polyoma virus-associated nephropathy: an effective treatment option in simultaneous pancreas and kidney transplant recipients.** Transpl Int. 2008 Apr;21(4):353-6.
IF 2008: 3,115
2. **Mindlova M**, Boucek P, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. **Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center.** Clin Transplant. Přijato k publikaci 5.4.2011
IF 2009: 2,004

9.1.2 Přednášky a postery na kongresech a sympóziích

1. **RETRANSPLANTATION FOR POLYOMAVIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE.**
Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec, Hirsch HH.
13 th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 30 September - 3 October 2007, Prague, Czech Republic, Poster presentation
2. **PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.**
Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
13 th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 30 September - 3 October 2007, Prague, Czech Republic, Poster presentation
3. **RETRANSPLANTATION FOR POLYOMAVIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE.**
Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, September 15 - 20, 2007, Minneapolis, MN.
Poster presentation

4. PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.

Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.

CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, September 15 - 20, 2007, Minneapolis, MN.

Poster presentation

5. PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.

Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.

XXII. Congress of the International Transplant Society, 10-14 August 2008, Sydney, Australia.

Oral presentation

6. NÍZKÁ PREVALENCE A INCIDENCE BK-VIRÉMIE A VIRURIE U PACIENTŮ PO KOMBINOVANÉ TRANSPLANTACI LEDVINY A PANKREATU V IKEM. Mindlova M, Boucek P, Saudek F,

Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.

II.Českosloveský transplantační kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, přednáška

7. LOW PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS IN A SINGLE CENTRE. Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.

28th Workshop of the AIDPIT Study Group, January 25-27, 2009, congresspark igls, Innsbruck- Igls, Austria, Poster presentation

8. BK virus infection in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients . Boucek P, Mindlova M, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M, Hirsch H.

Joint Meeting of the International-Pancreas-and-Islet-Transplant-Association/International Xenotransplantation-Association. Venice, ITALY, OCT 12-16, 2009, poster presentation

9.2 Publikace, které přímo nesouvisejí s tématem dizertační práce

9.2.1 Články

1. Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, **Mindlová M**, Girman P, Dovolilová E, Karasová L, Saudek F. **Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells.** Folia Biol (Praha). 2007;53(1):13-22.
IF 2007: 1,140
2. **MINDLOVÁ M**, SAUDEK F. **Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykemiemi, jeho klinické hodnocení a terapie.** Prakt. Léč. 2007, 87, No. 1, pp. 52-57
3. Saudek F., Girman P., Kříž J., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., Vávrová E., **Mindlová M.**, Habart D., Peregrin J., Lipár K., Oliverius M., Dovolilová E., Číhalová E., Bobek V. **Léčba diabetu transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků.** Čas. Léč. čes., 2011, 150, pp. 49-55.

9.2.2 Přednášky a postery na kongresech a sympóziích

1. **Izolace a charakterizace CXCR-4 pozitivních pankreatických buněk .**
Koblas T., Zacharovová K., Girman P., Berková Z., **Mindlová M.**, Kříž J., Dovolilová E., Saudek F. I.československý transplantační kongres, 16.-18.11. 2006, Brno, Poster
2. **ULTRASTRUKTURNÍ ANALÝZA ZNAČENÍ POTKANÍCH LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ SUPERPARAMAGNETICKÝMI PARTIKULEMI.**
Zacharovová K., Berková Z., Koblas T., Girman P., **Mindlová M.**, Kříž J., Dovolilová E., Vancová M., Nebesářová J., Saudek F.
I.československý transplantační kongres, 16.-18.11. 2006, Brno, Poster
3. **Ultrastructural analysis of islets labelling with superparamagnetic particles.**
K.Zacharovova , Z. Berkova , T. Koblas, L. Pektorova, **M. Mindlova**, P. Girman, J. Kriz, E. Dovolilova, M. Vancova, J. Nebesarova, F. Saudek.
26th Workshop of the AIDPIT Study Group, 1st European Diabetes Technology and Transplantation Meeting, 4.- 6.2.2007, Montpellier, France, poster presentation
4. **Islet and pancreas transplantation alone: one center short-term results.**
Girman, P., **Mindlova, M.**, Berkova, Z., Koblas, T., Zacharovova, K., Pektorova, L., Dovolilova, E., Vavrova, E., Koznarova, R., Bobek, V., Adamec, M., Lipar, K., Saudek, F.

44th Annual Meeting of the EASD European Association for the Study of Diabetes
Rome, Italy · 7-11 September 2008

5. Transplantace Langerhansových ostrůvků v IKEM - technika izolace

Dovolilová E., Girman P., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., **Mindlová M.**,
Vávrová E., Bobek V., Saudek F.

II. Československý transplantáční kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, poster

6. Transplantace Langerhansových ostrůvků

Bobek V., Girman P., Zacharovová K., Koblas T., Berková Z., Pektorová L., Dovolilová E.,
Vávrová E., **Mindlová M.**, Saudek F.

II. Československý transplantáční kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, poster

7. Post-transplant processing of superparamagnetic iron nanoparticles used for islet labeling and MR detection.

Zacharovova K, Berkova Z, Herynek V, Girman P, Koblas T, Pektorova L,
Mindlova M, Vavrova E, Vancova M, Nebesarova J, Dovolilova E, Bobek V, Saudek F.

Joint Meeting of the International-Pancreas-and-Islet-Transplant-
Association/International-Xenotransplantation-Association, Venice, ITALY, OCT 12-16,
2009 , poster presentation

8. TRANSPLANTACE LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ V IKEM.

Dovolilová E., Girman P., Kříž J., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L.,
Mindlová M., Vávrová E., Bobek V., Habart D., Saudek F.

III. československý transplantáční kongres, Špindlerův mlýn, 16.-18.9.2010, přednáška

**9. PŘÍPADOVÁ STUDIE PACIENTA S LABILNÍM DIABETES MELLITUS 1. TYPU
LÉČENÉHO TRANSPLANTACÍ LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ**

Bobek V., Kříž J., Girman P., Dovolilová E., Číhalová E., Berková Z., Vávrová E.,
Pektorová L., **Mindlová M.**, Saudek F.

III. československý transplantáční kongres, Špindlerův mlýn, 16.-18.9.2010, přednáška

**AUTONOMNÍ SELHÁNÍ ZPŮSOBENÉ RECIDIVUJÍCÍMI
HYPOGLYKÉMIEMI, JEHO KLINICKÉ HODNOCENÍ A TERAPIE**

MINDLOVÁ M, SAUDEK F.

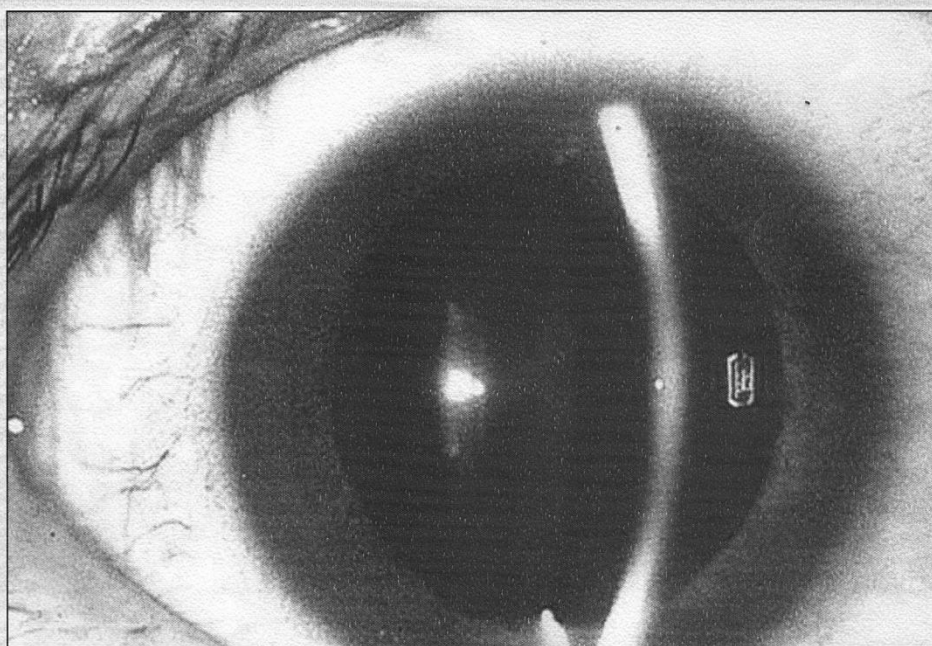
Prakt. Lék. 2007, 87, No. 1, pp. 52-57

PRAKTICKÝ LÉKAŘ

26. 1. 2007

87 / 1

ČASOPIS PRO DALŠÍ VZDĚLÁVÁNÍ LÉKAŘŮ V PRAXI



Chronická renální insuficience v primární péči ● Psychofarmaka v ordinaci praktického lékaře
podávaná v těhotenství a laktaci ● Současné možnosti diagnostiky a léčby Wilsonovy choroby
Biochemické molekulární mechanismy srdečního selhání – 2. část ● Diagnostika a léčba
revmatoidní artritidy – některé nové aspekty. ● Autonomní selhání způsobené recidivujícími
hypoglykemiemi, jeho klinické hodnocení a terapie ● Dětské úrazy a možnosti prevence ● Naše
zkušenosti s léčením akutní mesenterální ischemie ● Kraniofaryngeom u sedmdesáti
devítiletého muže ● Foramen ovale patens jako příčina paradoxní embolizace u potápěčů

Prakt. Lék., 2007, 87, č. 1, s. 1–64

OBSAH

EDITORIAL

Mařatka Z.: Cena života – 3

PŘEHLEDY

Teplan V.: Chronická renální insuficience v primární péči – 4

Mohr P.: Psychofarmaka v ordinaci praktického lékaře podávaná v těhotenství a v laktaci – 11

POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

Mareček Z.: Současné možnosti diagnostiky a léčby Wilsonovy choroby – 17

Trnavský K.: Diagnostika a léčba revmatoidní artritidy – některé nové aspekty – 22

Masopust J.: Biochemické molekulární mechanismy srdečního selhání – 2. část – 26

Z RŮZNÝCH OBORŮ

Urbášková P., Jakubů V., Žemličková H., Macková B.: Rezistence k antibiotikům u sedmi druhů invazivních bakterií, sledovaných v rámci EARSS v České republice v letech 2000–2006 – 32

Benešová V., Grivna M., Krejčí F.: Dětské úrazy a možnosti prevence – 39

Vokurka J., Žák J., Kábelka M., Veselý M., Čierník M.: Naše zkušenosti s léčením akutní mesenterické ischémie – 43

KAZUISTIKA

Šlapák J., Weber P., Mechl M., Křen L.: Kraniofaryngeom u 79letého muže – 46

DIAGNOSTIKA

Honěk T., Tomek A., Šrámek M., Januška J., Šefc L., Kereš R., Novotný L., Honěk Š., Veselka J.: Foramen ovale patens jako příčina paradoxní embolizace u potápěčů. Možnosti screeningu, terapeutická a preventivní doporučení – 48

TERAPIE

Mindlová M., Saudek F.: Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykemiemi, jeho klinické hodnocení a terapie – 52

PRÁVO A MEDICÍNA

Těšínová J.: Doktorské studijní programy a specializační vzdělávání lékařů – 58

HISTORIE/FEJTON

Káš S.: Olomoucký farmakolog profesor MUDr. Jiří Lenfeld – 59

AKTUALITY/ZPRÁVY/RECENZE

CONTENTS

Teplan, V.: Chronic renal failure in primary care – 4

Mohr P.: Prescription of psychotropic drugs during pregnancy and breast-feeding in the general practitioner's surgery – 11

Trnavský K.: Diagnostics and treatment of rheumatoid arthritis – some new aspects – 22

Mareček, Z.: Wilson's disease – 17

Masopust, J.: Biochemical molecular mechanisms of heart failure – part 2 – 26

Urbášková P., Jakubů V., Žemličková H., Macková B. and CZ – EARSS: Antimicrobial resistance in seven invasive bacterial species monitored within EARSS in the Czech Republic (CR) from 2000–2006 – 32

Benešová V., Grivna M., Krejčí, F.: Childhood injuries and their prevention – 39

Vokurka J., Žák J., Kábelka M., Veselý M., Čierník J.: Our experience with the treatment of acute mesenteric ischemia – 43

Šlapák J., Weber P., Mechl M., Křen L.: Cranio-pharyngioma in 79 years old man – a case study – 46

Honěk, T., Tomek A., Šrámek M., Januška J., Šefc L., Kereš R., Novotný Š., Honěk J., Veselka J.: Patent foramen ovale as a cause of paradoxical embolization in scuba divers. Screening possibilities, therapeutic and preventive recommendation – 48

Mindlová M., Saudek F.: Hypoglycaemia-associated autonomic failure, its clinical assessment and treatment – 52

<http://www.clsjep.cz>

Foto na obálce: Kayser-Fleischerův prstenec při osvětlu štěrbinovou lampou

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2007

PRAKTICKÝ LÉKAŘ

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Vedoucí redaktor: MUDr. Karel Filip, CSc., MBA.

Odpovědný redaktor: PhDr. Petr Rampír.

Tiskne: Tiskárna Prager – LD s. r. o., Kováků 9, 150 00 Praha 5.

Rozšiřuje: V ČR Nakladatelství Olympia, a. s., Praha, do zahraničí (kromě SR) – Myris trade s.r.o., V Štíhlách 1311/3, P.O.Box 2, 142 01 Praha 4, ve SR Mediaprint-Kapa Pressegrasso, a. s., odd. inéj formy predaja P.O.BOX 183, Vajnorská 137, 830 00 Bratislava 3, tel.: 02/444 588 21, fax: 02/444 588 19, e-mail: predplatne@abompka.sk.

Vychází 12krát ročně.

Předplatné na rok 780, Kč (1044,- Sk), jednotlivé číslo 65,- Kč (87,- Sk), studentské předplatné 360,- Kč (600,- Sk), jednotlivé číslo 30,- Kč (50,- Sk).

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá:

Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – J. Spalová, e-mail: spalova@cls.cz.

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Inzertní oddělení ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 224 266 252-3, tel./fax: 224 266 265, e-mail: ntsinzerce@cls.cz.

Registrační značka MK ČR E 737.

Rukopisy zasílejte na adresu: Praktický lékař, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Rukopis byl dán do výroby 3. 1. 2007

Zaslané příspěvky se nevracejí, jsou archivovány ČLS JEP.

Vydavatel získá otiskem příspěvku výlučné nakladatelské právo k jeho užití.

Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent.

Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoli formě či jakýmkoli způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopí, nahrávek, informačních databází na magnetických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

Zpracování pro internet provádí NT Servis, s.r.o., U Kněžské louky 53, 130 00 Praha 3, tel. 284 818 342-43, fax 284 820 956, e-mail: ntservis@ntservis.cz, internet: www.ntservis.cz.

Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykémiami, jeho klinické hodnocení a terapie

MINDLOVÁ M, SAUDEK F.

Centrum diabetologie, Praha

Přednosta: Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Klinika diabetologie, Praha

Přednosta: Doc. MUDr. František SAUDEK, DrSc.

Institut klinické a experimentální medicíny, Praha,

Ředitel: MUDr. Štefan Vítka, CSc.

SOUHRN

Hypoglykémie je nejčastější komplikace inzulínové terapie u diabetiků. Těžká hypoglykémie může poškodit nejen mozek, ale i myokard a autonomní nervový systém. Časté epizody způsobují selhání odpovědi autonomního nervového systému na pokles hladiny glukózy v krvi a narušují její regulaci. Změny způsobené recidivujícími hypoglykémiami prohlubují autonomní selhání a vedou ke stále častějším poklesům glykémie. Tento jev se nazývá HAAF (Hypoglycaemia-associated autonomic failure). Jeho patofyziologické mechanismy jsou již popsány, ale stále chybí klinické hodnocení. Exaktní kvantifikace frekvence a závažnosti hypoglykémii a míra narušení funkce autonomního nervového systému je důležitá pro volbu léčebného postupu. Proto byl vyvinut skórovací systém. Je prokázáno, že nejlepší terapií HAAF je transplantace Langerhansových ostrůvků nebo pankreatu. Funkční štěp zajistí dlouhodobou euglykémii nebo alespoň zmírní labilitu glykémie. Několik týdnů bez hypoglykémie je základní podmínkou terapie HAAF.

Klíčová slova: Hypoglykémie, diabetes mellitus, autonomní nervový systém, transplantace

SUMMARY

Mindlová M, Saudek F.: Hypoglycaemia-associated autonomic failure, its clinical assessment and treatment.

Hypoglycaemia is the most frequent complication of insulin therapy in diabetic patients. Severe hypoglycaemia may impair not only the brain, but also the heart and autonomic nervous system. Frequent episodes cause a failure of the autonomic nervous response to a falling blood glucose level and also impair its counter-regulation. The changes caused by repetitive hypoglycaemia deepen the autonomic failure and lead to more and more frequent episodes. This phenomenon has been called „hypoglycaemia-associated autonomic failure (HAAF)“. Its pathophysiological mechanisms have been described but there is still a need for its clinical assessment. The exact evaluation of the frequency and seriousness of hypoglycaemia, as well as the autonomic nervous impairment, is essential for the selection of further treatment procedures. For this reason a scoring system has been developed. Transplantation of either the islet of Langerhans or pancreas has been proven to be the best treatment of HAAF. A functioning graft ensures long-term euglycaemia or at least improves unstable glycaemia. The fundamental prerequisite for HAAF treatment is several weeks without hypoglycaemia.

Key words: hypoglycaemia, diabetes mellitus, autonomic nervous system, transplantation

Prakt. Lék., 2007, 87, No. 1, pp. 48–51

Úvod

Při léčbě diabetes mellitus je zvláště u mladších jedinců kladen důraz na těsnou metabolickou kompenzaci, protože chronická hyperglykémie souvisí s rozvojem pozdních makrovaskulárních i mikrovaskulárních komplikací. Při snaze o dosažení glykémii blízkých normě však stoupá riziko hypoglykémie. Hypoglykémie tak v současné době patří mezi nejběžnější komplikace inzulínové terapie, zvláště u pacientů léčených intenzifikova-

ným inzulínovým režimem a představuje hlavní limit inzulínové léčby diabetu.

Hypoglykémie ovšem nejsou bez rizika. Hlavním orgánem, pro který je glukóza takřka výhradním zdrojem energie, je mozek. Mozková tkáň spotřebuje ke svým metabolickým pochodům 50–60 % z celkového denního množství glukózy, které dodají játra do organismu. Při dlouhodobém hladovění mohou mozkové buňky po určitých změnách metabolismu využívat ketolátky jako náhradní energetický zdroj.

Definice pojmů

Pojem hypoglykémie nelze striktně definovat jako určitou hladinu glukózy v krvi. Jde o arbitrážní, biochemické kritérium, stanovené na základě průkazu změn v organismu při poklesu glykémie pod hodnoty běžné u zdravých jedinců. Fyziologické rozmezí lačné glykémie (euglykémie) je 3,5–5,5 mmol/l. Již při glykémii 4,6 mmol/l dochází k inhibici sekrece inzulínu v beta buňkách Langerhansových ostrůvků. Při poklesu glykémie pod 3,5–3,3 mmol/l lze detekovat zvýšení sekrece kontraregulačních hormonů (nejprve glukagonu, poté adrenalinu, ostatní kontraregulační hormony nastupují později při déletrvající hypoglykémii). Při dalším poklesu glykémie na 3,3–2,8 mmol/l nastupují klasické příznaky způsobené aktivací autonomního nervového systému (neurogenní). Při glykémii 2,8 mmol/l a nižší dominují příznaky postižení funkce CNS (neuroglykopenické).

U zdravých jedinců tak nastavení glykemického prahu pro aktivaci jednotlivých kontraregulačních mechanismů odpovídá koncentracím glukózy v krvi nutným pro správnou funkci organismu. Při jejím poklesu dojde včas a v dostatečné míře k aktivaci pochodů, které vedou ke znovuobnovení optimální glykémie. Na základě těchto poznatků lze rozdělit hypoglykémie do čtyř stupňů dle závažnosti (22):

1. bezpříznaková hypoglykémie:

zjištěná pouze biochemickým vyšetřením krve,

2. symptomatická mírná:

pacient sám pocítí příznaky hypoglykémie (aktivací autonomní odpovědi na pokles glykémie), nedojde k poruše vědomí, stihne zvrátit pokles glykémie požitím sacharidů.

3. symptomatická závažná:

pacient má poruchu vědomí a ke zvládnutí hypoglykémie potřebuje pomoc okolí.

4. kóma:

pacient ztrácí vědomí, někdy je tento stav provázen křečemi, většinou je nutná hospitalizace.

Již z povahy příznaků je zřejmé, že hodnocení frekvence jednotlivých stupňů hypoglykémie, které by vedlo k racionalizaci terapie diabetu s ohledem nejen na hyperglykémii, ale i na hypoglykémie, jejich tíži a frekvenci, je obtížné.

Hypoglykémie u pacientů léčených inzulínem (tj. pacienti s diabetes mellitus 1. typu a pokročilým diabetes mellitus 2. typu vyžadujícím inzulínovou terapii) jsou způsobeny souhrou absolutního či relativního nadbytku inzulínu na straně jedné, narušenou regulací glykémie a poruchou

rozpoznávání hypoglykémie na straně druhé. Hypoglykémie nastávají i u diabetiků léčených perorálními antidiabetiky, zvl. deriváty sulfonylurey, ovšem ve většině studií týkajících se patologického působení hypoglykémie na organismus byli zahrnuti inzulin-dependentní jedinci.

Soubor patofyziologických mechanismů vedoucí k opakování hypoglykemií je vysvětlován tzv. konceptem HAAF (hypoglycaemia – associated autonomic failure) (1). I když tento koncept není zatím všeobecně přijímán, poskytuje relativně ucelený pohled na problematiku hypoglykémie jako poruchy mnoha okruhů homeostatických regulací.

Prvotní příčinou spuštění kaskády opakování hypoglykemií je předcházející hypoglykémie. V jejím důsledku dojde k oslabení catecholaminové odpovědi na pokles glykémie v prostředí chybějící souhry vzájemné regulace sekrece inzulinu a glukagonu.

Dalším kritickým bodem přispívajícím k plnému rozvoji hypoglykémie je chybění nebo oslabení varovných příznaků poklesu glykémie („hypoglycaemia unawareness“), ke kterému rovněž přispívá oslabení sympatoadrenální odpovědi na hypoglykémii (tj. stresový podnět).

Porucha sekrece glukagonu se zdá být klíčová pro defektní regulaci glykémie. Je způsobena s největší pravděpodobností chyběním poklesu inzulinémie v Langerhansových ostrůvčích, což je za fyziologických podmínek hlavní signál vedoucí ke zvýšení sekrece glukagonu v odpovědi na klesající glykémii.

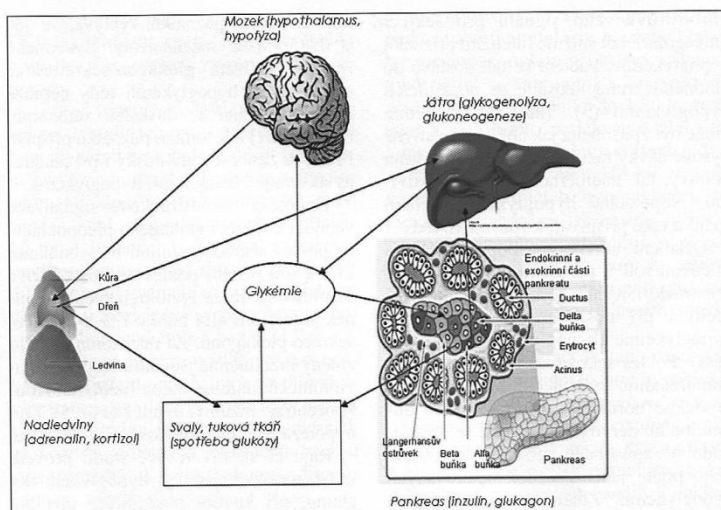
Hlavní příčinou oslabení sympatoadrenální odpovědi na klesající glykémii je pokles glykemického prahu, tj. hodnoty rozpoznávané regulačními mechanismy jako hraniční a nízké. Mechanismy změn glykemického prahu nejsou známy. Klíčovým momentem je zřejmě alterace metabolismu mozkové tkáně, hlavně hypothalamu. Hypoglykémie ovšem aktivuje rozsáhlé oblasti mozku včetně prefrontálního cortexu. Výsledkem těchto pochodů je bludný kruh recidivujících čím dál těžších hypoglykemií se všemi jejich důsledky.

Jedinou terapeutickou možností je důsledná prevence hypoglykemií. Po 2–3 týdnech bez epizody hypoglykémie dochází k ústupu frekvence hypoglykemií i u pacientů, kteří před léčebnou intervencí mívali hypoglykémie velmi často.

Fyziologie a patofyziologie regulace glykémie

Fyziologická hodnota lačné glykémie v plasmě je 3,5–5,5 mmol/l. Hladina glukózy je udržována v tomto rozmezí mnoha regulačními mechanismy.

Základním informačním vstupem rozpo-



Obr. 1. Schéma regulace glykémie za fyziologických podmínek

znávaným příslušnými efektorovými orgány je *glykémie*. Na lokální úrovni pokles glykémie u nediabetického jedince snižuje sekreci inzulinu v beta buňkách Langerhansových ostrůvků (LO) a stimuluje tvorbu glukagonu alfa buňkami. Pro správnou funkci tohoto mechanismu je ovšem důležitý kromě jiného i pokles inzulinémie uvnitř LO, který vyvolá zvýšení sekrece glukagonu. Dle posledních poznatků je zřejmě důležitá právě ona „velikost poklesu inzulinémie za určitou časovou jednotku“. Tato zpětná vazba chybí u osob s velmi sníženou až nulovou sekrecí inzulinu.

Na úrovni centrálního nervového systému (CNS) dojde při poklesu glykémie prostřednictvím hypothalamu jednak k aktivaci autonomního nervového systému, který zajistí produkci adrenalinu a noradrenalinu ve dření nadledvin a kortizolu v kůře nadledvin, a také k uvolnění somatoliberinu, který spustí sekreci růstového hormonu (STH) v hypofýze. I ostatní hormony zasahují do metabolismu glukózy, v regulaci glykémie však hrají jen malou roli.

Adrenalin, noradrenalin a glukagon zvyšují výdej glukózy z jater stimulací glykogenolýzy a glukoneogeneze z nekukerných zdrojů (aminokyseliny, laktát, glycerol). Kortizol stimuluje glukoneogeneze v játrech a zároveň snižuje využití glukózy ve tkáních. Růstový hormon snižuje využití glukózy v periferních tkáních. Základem protiregulace poklesu glykémie jsou zřejmě adrenalin a glukagon (obr. 1). Ostatní hormony mají jen doplňující účinek (2).

Hypoglykémie patří mezi významné stresory, tj. při poklesu glykémie pociťuje pacient úzkost, zhoršuje se soustředění,

zbledne, zvýší se pocení, zhorší se prokrvení aker, začne mít pocit hladu. Pokud glykémie nadále klesá, dostaví se porucha vědomí až kóma, nemocný může mít křeče podobné epileptickému záchvatu typu grand mal. Objektivním průkazem postižení CNS hypoglykemií jsou změny EEG a evokovaných potenciálů. Nastává zpomalení mozkové aktivity a prodloužení latencí na zrakové i jiné stimuly (22). Včas neléčená hypoglykémie může skončit letálně nebo mít trvalé následky.

U diabetiků s nedostatečnou produkcí inzulinu chybí při poklesu glykémie pokles nitroostrůvkové inzulinémie, čímž dochází k inhibici alfa buněk a ztrátě signálu nutného ke zvýšení sekrece glukagonu. Plasmatická koncentrace adrenalinu stoupá, ale vzestup je oslaben oproti kontrolním skupinám zdravých jedinců. Práh aktivace sympatiku je posunut k nižším hodnotám glykémie. V důsledku oslabení adrenergické reakce přestává pacient pociťovat varovné signály hypoglykémie. Oslabení aktivace sympatiku také přispívá k porušené regulaci glykémie. Dochází tak k výrazné diskrepanci mezi včasností a mírou aktivace kontraregulačních mechanismů vedoucích ke obnově euglykémie a reálnou hladinou glukózy v krvi, která již nestačí zajistit správnou funkci organismu.

HAAF u diabetiků léčených inzulinem

Teorie HAAF je založena na předpokladu, že poslední předcházející epizoda hypoglykémie u diabetiků léčených inzulinem prohlubuje jak poruchu regulace glykémie (redukci adrenalinové odpovědi na pokles glykémie v prostředí chybějící

nitroostrůvkového signálu pro sekreci glukagonu), tak snižuje intenzitu příznaků hypoglykémie. Pacient se tak dostává do bludného kruhu neustále se opakujících hypoglykemií (3). Tato hypoglykémie může být způsobena jak aplikací relativně vysoké dávky inzulínu vzhledem k příjmu potravy, tak nadměrnou fyzickou aktivitou. Nepoznané hypoglykémie během spánku také přispívají k rozvoji HAAF.

Oslabení adrenergní odpovědi hraje klíčovou roli v porušené regulaci glykémie (nedostatečnou glykogenolýzou v játrech) i při postupné ztrátě příznaků hypoglykémie (hypoglycaemia unawareness). Pokles sekrece se týká adrenalinu, noradrenalinu i acetylcholinu (1). Snižená produkce hormonů/neurotransmiterů autonomního nervového systému je pravděpodobně způsobena snížením glykemického prahu jako důsledek opakovaných hypoglykemií. Změna nastavení glykemického prahu se zdá být pravděpodobnější příčinou oslabení adrenergní odpovědi než snížení senzitivity tkání k hormonům autonomního nervového systému. Metabolické studie prokázaly, že senzitivita periferních tkání k adrenalinu není snížena u diabetiků 1. typu (6). Jiné práce ovšem ukazují, že snížená beta-adrenergní senzitivita může přispívat k zeslabování příznaků hypoglykémie. Regulační mechanismy glykémie jsou u diabetiků 1. typu dokonce citlivější k adrenalinu než u zdravých jedinců, což je zřejmě reakce na pokles jeho sekrece.

Klinická pozorování potvrzují, že již 2–3 týdny bez hypoglykémie navrací schopnost rozpoznat hypoglykémii a zlepšují narušenou regulaci glykémie zvýšením adrenergní odpovědi.

Mechanismus ztráty sekrece glukagonu – ztráta nitroostrůvkového poklesu inzulinémie

Ztráta glukagon-sekretorické odpovědi na pokles glykémie u diabetiků 1. typu a pacientů s diabetem 2. typu léčených inzulínem hraje klíčovou roli v poruše regulace glykémie a tedy i HAAF (1).

Tato porucha je selektivní. Glukagon-sekretorická odpověď alfa buněk LO na ostatní stimuly zůstává nenarušena. Z toho vyplývá, že jde o poruchu signalizace a nikoli o strukturální poškození alfa buněk (7). Ztráta sekrece glukagonu při poklesu glykémie těsně koreluje se ztrátou sekrece endogenního inzulínu, nekoreluje ovšem s tíží autonomní neuropatie obvyklé u diabetiků.

Glukagon-sekretorická odpověď je nepřítomná i u některých diabetiků s normální sympatickou reakcí na hypoglyk-

mii. Z tohoto poznatku vyplývá, že jde o dva odlišné mechanismy glykemické regulace. Ztráta glukagon-sekretorické odpovědi na hypoglykémii tedy nemůže být považována za důsledek autonomní neuropatie (1). K tomuto poznatku přispívá i fakt, že denervovaný lidský i psí pankreas secernuje glukagon při hypoglykémii.

Hypotéza nitroostrůvkové signalizace vedoucí k sekreci glukagonu předpokládá, že pokles sekrece inzulínu beta buňkami LO, a tím pádem pokles nitroostrůvkové inzulínémie, je za fyziologických podmínek signál pro alfa buňky LO k zahájení sekrece glukagonu. Za nepřítomnosti této změny inzulínémie jsou alfa buňky ve stavu tonické inhibice stálou (nebo nulovou) koncentrací inzulínu uvnitř LO (4, 5). Tato hypotéza byla nyní ověřována i u člověka.

Raju et al. (4) ve své studii provedl u 14 zdravých jedinců hypoglykemický clamp, při kterém byla infúzí inzulínu udržována kontrolovaná hypoglykémie. Současně byl podán diazoxid (agonista ATP-senzitivních kaliových kanálů) k potlačení bazální sekrece inzulínu. Kontrolní skupině bylo podáno placebo. Pokles endogenní produkce inzulínu (C-peptidu) během indukce hypoglykémie byl po diazoxidu o 50 % menší než v kontrolní skupině. Vzestup plasmatické koncentrace glukagonu byl také o 50 % nižší než v kontrolní skupině.

Naopak stimulace bazální sekrece inzulínu tolbutamidem, který způsobí zvýraznění poklesu nitroostrůvkové inzulínémie, zvýšila glukagonovou odpověď na hypoglykémii (5).

Shrnuto tedy, pokles nitroostrůvkové inzulínémie společně s poklesem glykémie je u zdravých jedinců signálem pro alfa buňky k produkci glukagonu. Absence tohoto signálu vysvětluje ztrátu sekrece glukagonu při klesající glykémii u inzulínem léčených diabetiků.

Příčiny ztráty příznaků hypoglykémie – porucha aktivace autonomního nervového systému

Po mnohaleté terapii inzulínem někteří pacienti tolerují nízkou glykémii s minimální intenzitou příznaků. Ztráta varovných příznaků způsobí, že se pacient včas nenajde, a glykémie klesá až dojde k poruše vědomí. Tato porucha byla dlouhou dobu považována za ireverzibilní komplikaci diabetu. Klinická pozorování však ukázala, že důsledná prevence hypoglykemií po dobu několika měsíců vedla u většiny pacientů k obnově příznaků při poklesu glykémie.

Příznaky hypoglykémie jsou jednak neuroglykopenické, tj. způsobené přímým vlivem deficitu glukózy na metabolismus

mozkové tkáně, a *autonomní (neurogenní)*, které jsou způsobeny uvolněním hormonů autonomního nervového systému (zprostředkováno CNS). Tento mechanismus je spuštěn při poklesu glykémie pod určitou hodnotu.

Autonomní příznaky hypoglykémie jsou *adrenergní a cholinergní*. Adrenergní jsou zprostředkovány katecholaminy (adrenalin, noradrenalin) a zahrnují palpitace, tremor, úzkost, nervozitu. Jsou uvolňovány postganglionárním neuronem sympatiku a dřením nadledvin. Mezi cholinergní příznaky hypoglykémie patří pocení, pocit hladu, parestézie. Jsou zprostředkovány acetylcholinem, který je secernován postganglionárním neuronem parasympatiku.

Uvědomování si hypoglykémie je z velké části výsledkem aktivace autonomního nervového systému, zvláště pak sekrece adrenalinu ve dření nadledvin. Studie na zdravých dobrovolnících ukázaly, že po podání antagonistů autonomních hormonů došlo k 70 % redukci příznaků hypoglykémie (8).

Snížení aktivace autonomního nervového systému poklesem glykémie pod určitou hodnotu je zřejmě hlavní příčinou ztráty varovných signálů nástupu hypoglykémie.

Změna nastavení glykemického prahu pro aktivaci sympatoadrenální odpovědi

Mnohými klinickými studiemi bylo potvrzeno, že hypoglykémie u diabetiků léčených inzulínem redukuje neuroendokrinní, symptomatickou i kognitivní dysfunkci. Tento jev těsně koreluje s počtem a intenzitou předchozích epizod hypoglykemií (1). Na základě těchto pozorování byla postulována hypotéza, že opakované hypoglykémie posunují glykemický práh k nižším hodnotám.

Jak bylo předesláno dříve, oslabení sympatoadrenální odpovědi na pokles glykémie způsobené předcházející epizodou hypoglykémie hraje klíčovou roli jak v poruše regulace glykémie v prostředí chybění poklesu nitroostrůvkového signálu k sekreci glukagonu, tak v porušeném vnímání hypoglykémie. Každá další epizoda hypoglykémie prohlubuje poruchu regulace glykémie posunem glykemického prahu k nižším hodnotám. Mechanismus, kterým se tak děje, není dosud znám. Bylo postulováno několik hypotéz, z nichž některé podrobněji zmíním dále.

Hypotéza poklesu adrenomedulární sekretorické kapacity

Hladina glykémie je kromě beta buněk pankreatu rozpoznávána i tělísky v aa. carotides, ve vena porta a v předním a ve středním mozku. Aferentní nervová vlák-

na vedou informaci do hypothalamu, kde po zpracování je signál předán eferentními drahami do efektorových orgánů, tj. hlavně dřeň nadledvin.

Více než 90 % adrenalinu v plazmě je produkováno v dřeni nadledvin (9), proto jeho plasmatická koncentrace může být považována za ukazatel adrenomedulární kapacity jej produkovat (9). De Gallan et al. (10) pozoroval u diabetiků 1. typu až o 25 % nižší bazální hladinu metanefrinu (metabolit adrenalinu) v plasmě než u zdravých kontrol. Sympatoadrenální odpověď na hypoglykémii byla u pacientů s diabetem rovněž významně oslabena oproti zdravým jedincům. Autoři tento poznatek interpretovali jako nepřímý důkaz snížené adrenomedulární kapacity produkce adrenalinu u těchto pacientů. Tato porucha může přispívat ke snižování glykemického prahu. Další výzkumy ukázaly, že za snížením adrenomedulární kapacity stojí snížení aktivity některých enzymů, podílejících se na syntéze adrenalinu (konkrétně aktivita tyroxin-hydroxylázy a fenyletanolamin-N-metyl transferázy) u diabetických pacientů.

Hypotéza systémové působícího mediátoru

Hypotéza systémového mediátoru předpokládá, že zvýšené hladiny kortizolu (nebo jiného hormonu) stimulované předcházející hypoglykemií působí na mozek a přes hypothalamus redukuje sympatoadrenální aktivitu. Tato hypotézu poprvé formuloval Davis et al. (11), který provedl studii u zdravých dobrovolníků, jimž byla podána infuze kortizolu při normální glykémii. Následující den u stejných osob byla navozena hypoglykémie. Adrenomedulární odpověď byla výrazně snížena. Tento název byl podepřen dalšími pozorováními, kdy u pacientů s primárním adrenokortikálním selháním, kteří nemohli produkovat endogenní kortizol, nebyl patrný efekt předcházející hypoglykémie. Další studie provedené s nižšími dávkami kortizolu ovšem neprokázaly redukcí sekrece adrenalinu. V současné době se proto kortizol nejeví jako hlavní příčina posunu glykemického prahu, a tedy HAAF.

Hypotéza transportu mozkových nutrientů

Tato hypotéza vychází z tvrzení, že předcházející hypoglykémie zvyší intenzitu transportu glukózy (nebo jiného paliva využitelného pro metabolismus neuronů) z krve do mozku prostřednictvím up-regulace transportních mechanismů hematoencefalické bariéry. Zvýšením intenzity transportu glukózy do mozku tak klesne senzitivita k hypoglykémii (1).

Tato hypotéza byla vyslovena na základě experimentů, kdy u potkanů po třech a více dnech (!) trvající hypoglykémii

došlo k nárůstu počtu mikrovaskulárních GLUT-1 kanálů (resp. jejich m-RNA) v mozku a ke zvýšení vstupu glukózy do mozku.

U lidí (zdravých dobrovolníků) však ani po 24hodinách trvající interprandiální hypoglykémii nestoupla rychlost transportu glukózy do mozku. Redukce sympatoadrenální odpovědi byla však po této době signifikantní, stejně jako oslabení příznaků hypoglykémie. U pacientů s diabetes mellitus 1. typu nebyl sledován žádný rozdíl v globální intenzitě transportu glukózy do mozku mezi jedinci s poruchou rozpoznávání hypoglykémie a bez ní (12).

U potkanů byly prováděny experimenty na posouzení regionálních rozdílů aktivity transportu glukózy do mozku, ale ani tyto nepotvrdily rozdíly v koncentracích glukózy v odlišných oblastech mozku (ventromediální hypothalamus, hippocampus, mozkový kmen).

Recentní studie potvrzují, že u lidí předcházející epizoda hypoglykémie nezvyšuje koncentraci glukózy v mozku (13), což bylo ověřováno NMR spektroskopii i pozitronovou emisní tomografií průkazem glukózy značené radioaktivním izotopem uhlíku.

Co se týče jiných možných substrátů energetického metabolismu neuronů, byl u diabetiků 1. typu prokázán vyšší mozkový uptake acetátu a laktátu, což by mohlo být příčinou vzniku HAAF. Chybí však důkaz, že tento jev je specifický pro diabetiky léčené inzulínem, kteří zároveň mají poruchu rozpoznávání hypoglykémie.

Hypotéza alterace mozkového metabolismu

Hypotéza poškození metabolismu mozkové tkáně předcházející hypoglykemií předpokládá, že hypoglykémie zasáhla do mechanismů senzování hladiny plasmatické glukózy nebo do funkce neuronů příslušných oblastí mozku, což vyúsťuje v nedostatečnou odpověď CNS a následně všech dalších podřízených struktur na pokles glykémie.

Pozornost byla zaměřena zejména na ventromediální jádra hypothalamu (VMN), kde při glukopenii došlo k aktivaci sympatoadrenálního systému a zvýšení sekrece glukagonu (14). Dalšími experimenty bylo prokázáno, že při perfúzi této oblasti glukózou a systémové hypoglykémii byly výrazně oslabeny kontraregulační mechanismy u nediabetických potkanů. Výsledky ukazují, že oblast ventromediálních hypothalamických jader je odpovědná za monitoring glykémie a hraje tak klíčovou roli v její regulaci. Nicméně při aktivaci mechanismů kontraregulace glykémie dochází u experimentálních zvířat i u člověka k ovlivnění (změně perfúze) mnoha oblastí mozku

včetně cortexu (15). Pokles perfúze jako reakce na deficit glukózy zasahuje hlavně hippocampus, ovšem při aktivaci sympatoadrenální a symptomatické odpovědi u zdravých dobrovolníků dochází ke změnám i v thalamu, periaqueductální šedi a mediálním prefrontálním cortexu (15).

Mechanismus vzniku HAAF za podmínek recidivujících hypoglykemií by tedy mohl zahrnovat jak změnu citlivosti neuronů senzujících glykémii v oblasti VMN hypothalamu, tak poruchu vedení vzruchu neuronem a narušení synaptických funkcí v mnoha oblastech mozku včetně mozkové kůry.

Z možných alterací metabolismu neuronů opakovanými epizodami hypoglykémie připadá v úvahu zvýšení aktivity *glukokinázy* v neuronech senzujících glykémii, které vede k jejich desenzitizaci. Dále může docházet k poruchám funkce ATP řízených kaliových kanálů, k poklesu aktivity protein-kináz nebo naopak ke zvýšení GABA-ergního tonu. Rolí může hrát i porucha inzulínové signalizace v mozkové tkáni.

Bingham et al. (12) pozoroval pokles intenzity metabolismu glykózy během hypoglykémie u diabetiků 1. typu, kteří měli poruchu vnímání hypoglykémie, zatímco u diabetiků 1. typu bez poruchy vnímání hypoglykémie došlo při poklesu glykémie naopak k nárůstu intenzity mozkového metabolismu.

Hypotéza superkompenzace CNS glykogenem

Tato hypotéza předpokládá, že po epizodě hypoglykémie dojde v mozkové tkáni působením astrocytů k prudkému nárůstu hladiny glykogenu, které převyší pre-hypoglykemické hodnoty a poskytne tak neuronům dostatek glykolytických substrátů (glykogen, ale i laktát) na překlenutí období nedostatku glukózy. Vzhledem k nasycení potřeby neuronálního metabolismu alternativními substráty glykolýzy je oslabena sympatoadrenální odpověď na nedostatek glukózy.

Měřením u potkanů metodou NMR spektroskopie bylo prokázáno, že během epizody hypoglykémie došlo k poklesu množství mozkového glykogenu, ale během následujících 7 hodin po této epizodě koncentrace glykogenu v mozku stoupla na 150 % bazální hodnoty (16).

Fenomén superkompenzace mozku glykogenem zřejmě přispívá k rozvoji HAAF spolu s jinými mechanismy alterace mozkového metabolismu, i přes námitky, že množství zásob glykogenu v mozku je o několik řádů menší než v játrech či svalích a že při globální mozkové ischémii dojde k jejich vyčerpání za 3-5 minut. Glykolýza se tak podílí pouze několika málo procenty na pokrytí metabolických potřeb mozku.

Příčiny vzniku HAAF – shrnutí

Recidivující hypoglykémie u diabetiků léčených inzulínem (diabetes mellitus 1. typu, a diabetes mellitus 2. typu vyžadující inzulínovou terapii), jsou velmi pravděpodobně hlavní příčinou vzniku HAAF, nicméně byly pozorovány další okolnosti, které vzniku tohoto fenoménu napomáhají.

Fyzická aktivita, která předcházela epizodě hypoglykémie, způsobila oslabení sympatoadrenální odpovědi (17), ale nezasáhla do intenzity neurogenních symptomů hypoglykémie. Oslabením aktivace sympatikou ovšem fyzická aktivita posiluje patofyziologické pochody přispívající ke vzniku HAAF syndromu.

Dalším faktorem, který přispívá ke vzniku HAAF syndromu, jsou noční hypoglykémie. Během spánku je snížena sympatoadrenální odpověď na pokles glykémie. Bylo prokázáno, že diabetici 1. typu zaspí hypoglykémii s větší pravděpodobností než zdraví jedinci (18). Redukovaná sympatoadrenální odpověď způsobí jednak pomalejší mobilizaci glykogenu ze zásob, v prostředí chybní poklesu nitrostrůvkové inzulínémie se nezačne secernovat glukagon, navíc je díky spánku oslabeno vnímání poklesu glykémie. Ke ztrátě vnímání hypoglykémie patří i porucha probouzení se ze spánku při hypoglykémii.

K příčinám vzniku HAAF tedy patří hlavně recidivující hypoglykémie. Každá epizoda hypoglykémie působením patofyziologických pochodů na regulaci glykémie a funkci autonomního i centrálního nervového systému prohlubuje jejich dysfunkci a pacient se dostává do bludného kruhu stále častějších a těžších hypoglykemií. Mezi

další okolnosti, které posilují patofyziologické pochody vedoucí ke vzniku HAAF, patří fyzická aktivita předcházející epizodě hypoglykémie a nepoznané hypoglykémie během spánku (obr. 2).

Pro klinickou diagnostiku HAAF je zapotřebí uvést do praxe exaktní metodu, která zhodnotí frekvenci a tíži hypoglykemií a míru autonomní odpovědi v závislosti na stupni hypoglykémie.

Následky hypoglykémie

Kromě vzniku HAAF syndromu, který je podrobně rozebrán výše, hypoglykémie negativně působí na CNS, a jak ukazují nejnovější poznatky, i na srdce.

V mozku působí glukopenie nejprve alterací metabolismu mozkové tkáně, která se nejdříve projeví v metabolicky neaktivnějších oblastech (cortex). Při často recidivujících epizodách hypoglykémie dochází k odumírání neuronů, hlavně v mediálním prefrontálním kortexu a rostrálních regionech mozku (19). Výsledkem dlouhodobého působení opakovaných hypoglykemií je zhoršování paměti a kognitivních funkcí.

Těžká hypoglykémie způsobí během několika minut kóma, které může být doprovázeno křečemi. Neléčená může vést k úmrtí pacienta. Ze všech úmrtí souvisejících s diabetem připadá asi 7 % na úmrtí, kde hypoglykémie byla jejich bezprostřední příčinou.

Edge et al. (20) hodnotili příčiny úmrtí u dětí do 19 let s diabetem mellitus 1. typu. Největší procento úmrtí v souvislosti s diabetem bylo způsobené edémem mozku při diabetické ketoacidóze (62-82 %). K těmto úmrtím došlo převážně během

hospitalizace. Hypoglykémie jako bezprostřední příčina smrti byla uvedena u 8,1 % zemřelých. Byla to převážně náhlá úmrtí doma, často během spánku.

Dle recentních studií se potvrzuje, že hypoglykémie ovlivňuje i myokard, respektive zasahuje do repolarizačních mechanismů srdečního svalu. Bell et al. (21) formuloval hypotézu tzv. „dead in bed“ syndromu, což vystihuje situaci, kdy dojde k náhlému úmrtí během spánku. Jako příčina úmrtí byla zvažována arytmie způsobená hypoglykemií. Holterovská měření u mnoha pacientů prokázala, že při hypoglykémii dochází k prodloužení QT intervalu. QT interval, respektive QT interval korigovaný vzhledem k srdeční frekvenci (QTc), je prodloužený u pacientů s vrozenou nebo získanou poruchou sodíkových a draslíkových kanálů myokardu. To vyúsťuje v repolarizační anomálii asociované s arytmií typu „torsade-de-pointes“, která může spustit fibrilaci komor. U této arytmie je 13 % riziko náhlého úmrtí, které je často jediným jejím příznakem.

Vznik této arytmie je výrazně potencionován při zvýšeném tonu sympatiky. Dalšími rizikovými faktory kromě hypoglykémie a sympatikotonie jsou prolaps mitrální chlopně, autoimunitní onemocnění štítné žlázy (spojené s hyperthyreózou) a srdeční dysautonomie (často asociována s přítomností prolapsu mitrální chlopně).

Oslabení sympatoadrenální odpovědi v rámci HAAF syndromu se zdá být v tomto případě protektivním faktorem vzniku arytmie během hypoglykémie.

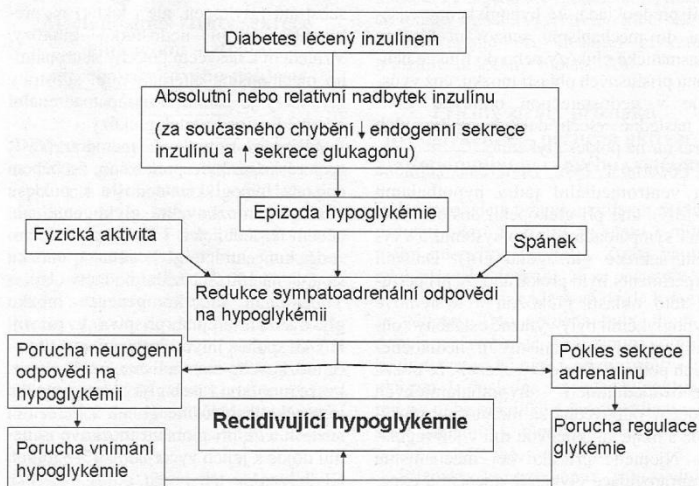
Nejohroženější skupinou z hlediska vzniku maligní arytmie během hypoglykémie jsou tedy mladí diabetici 1. typu s krátkým trváním diabetu bez narušené aktivace autonomního nervového systému s přítomností autoimunitní endokrinopatie a srdeční dysautonomií.

Klinické přístupy

Vzhledem k riziku obecně známých pozdních komplikací diabetes mellitus, způsobených dlouhodobě vysokými glykemiemi, je nutná co nejtěsnější kompenzace diabetu. Těsná kompenzace diabetu ovšem znamená zvýšené riziko vzniku hypoglykémie. Hypoglykémie jsou pro pacienta velmi stresující a rizikové. Jediným rozumným řešením je proto omezit frekvenci a tíži epizod hypoglykémie a zároveň udržet dobrou kompenzaci diabetu.

Klinická pozorování totiž potvrzují, že již 2–3 týdny bez hypoglykémie navrací schopnost rozpoznat hypoglykémii a zlepšují narušenou regulaci glykémie zvýšením adrenergní odpovědi.

Při posuzování dlouhodobé kompenzace diabetu se v běžné praxi opíráme o hod-



Obr. 2. Schéma příčin vzniku HAAF (upraveno z citace 1)

noty glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}). K objektivizaci závažnosti a frekvence hypoglykemií se však tento parametr nehodí. Ryan et al. (23) ve své práci navrhli postup, jak pomocí záznamů glykemií a okolností, které je provázely, lze objektivně zhodnotit tíži a frekvenci hypoglykemií a určit velikost výkyvů glykémie během dne. K základním pojmům, které zavedl, patří tzv. **HYPO skóre a index lability (LI)**.

HYPO skóre pro každého pacienta bylo spočteno na základě zhodnocení „glykemického deníku“, kam pacient zaznamenával po dobu jednoho měsíce, kolikrát naměřil glykémii v rozmezí 2,9–2,5 mmol/l a méně než 2,5 mmol/l a jaké okolnosti toto provázely. Při hypoglykémii bez přítomnosti varovných příznaků byly připočteny body navíc, stejně jako když převažovaly neuroglykopenické příznaky nad neurogenními. Pokud zvládnutí hypoglykémie vyžadovalo aplikaci glukagonu nebo přivolání záchranky, byl této epizodě přidělen maximální počet bodů. Kromě glykemického deníku lze použít i dotazník. Ten se hodí hlavně pro retrospektivní hodnocení. Statistickým zpracováním byly výsledné hodnoty HYPO skóre u jednotlivých pacientů rozděleny dle percentilů do tří stupňů. Obecně, čím více bodů pacient získal, tím závažnějším problémem byly jeho hypoglykémie. U pacientů s vysokým HYPO skóre bylo i vyšší riziko asymptomatické hypoglykémie.

Index lability je vypočten z hodnot glykemií měřených v určité hodině během čtyř týdnů a z časových intervalů mezi měřeními. Hodnota LI se počítá za každý týden zvlášť. Jde o druhou mocninu součtu rozdílů glykemií dělených součtem časových intervalů mezi měřeními. Jako výsledek byla brána průměrná hodnota ze všech čtyř týdnů. Index lability vypovídá o výkyvech glykémie. Čím vyšší je hodnota LI, tím labilnější má pacient glykémie.

Metody přesného hodnocení závažnosti hypoglykemií u diabetiků jsou nutné k optimalizaci terapeutických přístupů a k porovnání jejich účinnosti. K zásadám racionální terapie diabetu patří, aby se aplikace inzulínu co nejvíce blížila jeho fyziologické produkci. Pokud u diabetika léčeného intenzifikovaným inzulínovým režimem (IIR) jsou zaznamenány těžké hypoglykémie, lze jako první krok zavést terapii inzulínovou pumpou (CSII). U zvláště labilního diabetu s těžkými hypoglykemiemi, které jsou špatně zvladatelné i při CSII terapii, je namísto zvažito transplantační léčbu.

U neuremických diabetiků připadá v úvahu izolovaná transplantace pankreatu nebo Langerhansových ostrůvků (LO). Rozhodování o transplantační léčbě diabetu je vždy komplexní. Je nutno brát

v úvahu věk pacienta, jeho další onemocnění, celkový fyzický stav, rizika plynoucí z operačního zákroku a dlouhodobé imunosupresivní terapie.

Hlavní indikací pro izolovanou transplantaci pankreatu (24) i Langerhansových ostrůvků (23) je labilní diabetes s poruchou vnímání hypoglykémie a těžkou formou autonomní neuropatie (HAAF) a s rychlou progresí mikroangiopatických komplikací diabetu i přes optimální inzulínový režim. Po orgánové transplantaci pankreatu je zpravidla navozena normoglykémie bez nutnosti podávat exogenní inzulín a hypoglykémie se nevyskytují. Po transplantaci LO je často nutné v inzulínové léčbě přechodně či trvale pokračovat, avšak dojde ke snížení frekvence i závažnosti hypoglykemií, k úpravě autonomní dysfunkce i regulace glykémie.

Ryan et al. (23) porovnávali HYPO skóre a index lability u pacientů před a po transplantaci LO. Kontrolní skupinou byli diabetici 1. typu léčení inzulínem. U transplantovaných pacientů došlo k významnému poklesu HYPO skóre i LI v porovnání se stavem před transplantací. Jejich výsledek byl také lepší než u diabetiků léčených inzulínem.

Nejnovější studie ukazují, že transplantace inzulín produkujících buněk (LO) nebo celého pankreatu je nejlepší léčbou syndromu HAAF, není ovšem bez rizika. Proto je třeba vždy pečlivě zvážit její přínos pro pacienta i její možná rizika (cost-benefit score). K tomu je důležité mít metody objektivizace frekvence a tíže hypoglykemií a HAAF. Exaktní posouzení závažnosti HAAF dovolí i porovnání stavu pacienta před a po transplantaci stejně jako srovnání jednotlivých léčebných postupů navzájem.

Literatura

1. Cryer, P.E. Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure and its component syndromes in diabetes. *Diabetes*, 2005, 54, pp. 3592-3601.
2. Gannon, W.F. Přehled lékařské fyziologie. Praha: nakladatelství H+H, 1999.
3. Cryer, P.E. Diverse causes of hypoglycemia associated autonomic failure in diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, pp. 2272-2279.
4. Raju, B., Cryer, P.E. Loss of the decrement in intraslet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin deficient diabetes. *Diabetes*, 2005, 54, pp. 757-764.
5. Israelian, Z., Gosmanov, N.R., Szoke, E. et al. Increasing the decrement in insulin secretion improves glucagon responses to hypoglycemia in advanced type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2005, 28, pp. 2691-2696.
6. Divertie, G.D., Jensen, M.D., Cryer, P.E. et al. Lipolytic responsiveness to epinephrine in nondiabetic and diabetic humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 1997, 272, E 1130-E 1135.
7. Hoffman, R.P., Singer-Granick, C., Drash, A.L. et al. Abnormal sloba cell hypoglycemic recognition of in children with insulin dependent diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol.*, 1994, 7, pp. 225-234.
8. Towler, D.A., Havlin, C.E., Craft, S. et al. Mechanisms of awareness of hypoglycemia: perception of neurogenic (predominantly cholinergic) rather than neuroglycopenic symptoms. *Diabetes*, 1993, 42, pp. 1791-1798.
9. Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S. et al. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.*, 2004, 56, pp. 331-349.
10. de Galla, B.E., Tack, C.J., Willemsen, J.J. et al. Plasma metanephrine levels are decreased in type 1 diabetic patients with a severely impaired epinephrine response to hypoglycemia, indicating reduced adrenomedullary stores of epinephrine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89, pp. 2057-2061.
11. Davis, S.N., Shavers, C., Costa, F. et al. Role of cortisol in the pathogenesis of deficient counter-regulation after antecedent hypoglycemia in normal humans. *J. Clin. Invest.*, 1996, 98, pp. 680-691.
12. Bingham, E.M., Dunn, J., Sutcliffe-Goulden, J. et al. The effect of hypoglycemia unawareness on brain glucose content, transport and metabolism during euglycaemia and hypoglycaemia in man (Abstract). *Diabetologia*, 2004, 47, A 83.
13. Criego AB, Tkac I, Kumar A, et al. Brain glucose concentrations in healthy humans subjected to recurrent hypoglycemia (abstract). *Diabetes* 2005, 54 (Suppl. 1): A156.
14. Routh, V.H. Glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMN) and hypoglycemia associated autonomic failure (HAAF). *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2003, 19, pp. 348-356.
15. Dunn, J., Cranston, I.C., Marsden, P.K. et al. Measurement of brain perfusion in response to acute hypoglycaemia in healthy volunteers: a ^{15}O -water positron emission tomography study (abstract). *Diabetologia*, 2004, 47 (Suppl. 1), A 322.
16. Choi, I-Y., Seaquist, E.R., Gruetter, R. et al. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.*, 2003, 72, pp. 25-32.
17. McGregor, V.P., Greiwe, J.S., Banarier, S. et al. Limited impact of vigorous exercise on defense against hypoglycemia: relevance to hypoglycemia-associated autonomic failure. *Am. J. Physiol.*, 2001, 280, pp. E 908-E 917.
18. Branner, S., Cryer, P.E. Sleep-related hypoglycemia-associated autonomic failure in type 1 diabetes: reduced awakening from sleep during hypoglycemia. *Diabetes*, 2003, 52, pp. 1195-1203.
19. Tkacs, N.C., Pan, Y., Raghupathi, R. et al. Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 2005, 25, 12, pp. 1645-1655.
20. Edge, J.E., Ford-Adams, M.E., Dunger, D.B. et al. Causes of death in children with insulin dependent diabetes 1990-96. *Arch. Dis. Child.*, 1999, 81, pp. 318-323.
21. Bell, D.S.H. Dead in bed syndrome – a hypothesis. *Diabetes Obesity Metab.*, 2006, 8, pp. 261-263.
22. Perušičová, J., Smahelová, A. a kol. Hypoglykémie jako komplikace terapie diabetes mellitus. *Trendy soudobé diabetologie* 1998, 1, s. 91-124.
23. Ryan, E.A., Sandro, E., Green, K. et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*, 2004, 53, pp. 955-962.
24. Saudek, F., Bouček, P., Adamec, M. Izolovaná transplantace pankreatu – kdo a kdy?. *Čas. Lék. Čes.*, 2001, 140, 7, 195-199.

MUDr. Martina Mindlová
 Děbolínská 1042/26
 148 00 Praha 4
 e-mail: martina.mindlova@seznam.cz

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN CXCR4-POSITIVE
PANCREATIC CELLS**

Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, **Mindlová M**, Girman P, Dovolilová E,
Karasová L, Saudek F

Folia Biol (Praha). 2007;53(1):13-22



53 - 2007

Volume 53 (2007)

1

FOLIA BIOLOGICA

Journal of Cellular and Molecular Biology



Národní lékařská knihovna

Uznané
20.04.2008

Název: Folia biologica

Náz.č./Řada:

NLK
ABA008

Rok./Sv./Č.: 2007 / 53 / 1-6 / s.: 1-227



1102001132200253

Přir. č.: P213738

Sign: A 970

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FIRST FACULTY OF MEDICINE

A 970/213738

00

Contents

Review

Transcription Protein STAT1: Biology and Relation to Cancer

L. Adámková, K. Součková, J. Kovařík 1

Original Articles

Intracellular Distribution of Photofrin® in Malignant and Normal Endothelial Cell Lines

J. Saczko, M. Mazurkiewicz, A. Chwilkowska, J. Kulbacka, G. Kramer, M. Ługowski,
M. Śnietura, T. Banaś 17

Isolation and Characterization of Human CXCR4-Positive Pancreatic Cells

T. Koblas, K. Zacharovová, Z. Berková, M. Mindlová, P. Girman, E. Dovolilová,
L. Karasová, F. Saudek 13

Differential Diagnosis of Gingival Hyperplasia Based on IFN- γ -stimulated Gene Expression Using RT-PCR

I. Niedzielska, D. Sypniewski, U. Mazurek, T. Wilczok, Z. Niedzielski 23

The Influence of Three Endothelin-1 Polymorphisms on the Progression of IgA Nephropathy

D. Maixnerová, M. Merta, J. Reiterová, J. Štekrová, R. Ryšavá, H. Obeidová, O. Viklický,
P. Potměšil, V. Tesař 27

Technical note

Phenotypic Characterization of Porcine Interfollicular Keratinocytes Separated by Elutriation: a Technical Note

J. Klíma, J. Motlík, H.-J. Gabius, K. Smetana, Jr. 33

FOLIA BIOLOGICA

JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE – FIRST FACULTY OF MEDICINE

VOLUME 53

Editor-in-Chief: T. Zima

Executive Editors: J. Bubeník, Z. Kostrouch, K. Smetana Jr.

Editorial Board:

A. Azzi, Boston
J. Borovanský, Prague
J. Forejt, Prague
H.–J. Gabius, Munich
P. Hamet, Montreal
E. A. Jannini, L'Aquila
L. Kaczmarek, Warsaw
V. Křen, Prague
K. Kuchler, Vienna
P. Martásek, Prague
E. Nečas, Prague

V. R. Preedy, London
P. A. Riley, London
P. Rovero, Firenze
H. Rüdiger, Würzburg
H. Seitz, Heidelberg
S. Štípek, Prague
J. Svoboda, Prague
C. Szpirer, Brussels
H. Tlaskalová, Prague
C. Wanner, Würzburg
A. Žák, Prague

Indexed in Science Citation Index, Medline, Index Medicus, EMBASE/Excerpta Medica

FOLIA BIOLOGICA (ISSN 0015-5500, MK ČR E 3692) is published bi-monthly by Charles University in Prague – First Faculty of Medicine, and printed by Nuclear Information Centre, Elišky Přemyslovny 1335, 156 16 Prague – Zbraslav, Czech Republic.

Editorial Office: U Nemocnice 4, 128 52 Prague 2, Czech Republic, Office Director K. Šubrtová

Phone: (+420) 224 965 670; Phone/Fax: (+420) 224 965 674; e-mail: kveta.subrtova@lf1.cuni.cz

Fulltext published papers can be retrieved from the World Wide Web (<http://www.lf1.cuni.cz>).

Subscriptions in the Czech Republic are accepted by Myris Trade Ltd., P.O.Box 2, V Štíhlách 1311, 142 01 Prague 4, Czech Republic. Phone: (+420) 234 035 200; Fax: (+420) 234 035 207, (+420) 244 470 778; e-mail: myris@myris.cz. Subscriptions from abroad: orders from abroad are executed exclusively by Myris Trade Ltd., P.O.Box 2, Phone: (+420) 234 035 200, (+420) 234 035 201; Fax: (+420) 234 035 207, (+420) 244 470 778; e-mail: myris@myris.cz. Information on subscription prices is available on request.

Advertising is accepted in the Folia Biologica. Information on rates, specifications, etc., is available on request.

© Charles University in Prague – First Faculty of Medicine

Printed in the Czech Republic

Isolation and Characterization of Human CXCR4-Positive Pancreatic Cells

(diabetes mellitus / insulin / pancreas / β cell / islets / stem cells / CXCR4)

T. KOBLAS, K. ZACHAROVÁ, Z. BERKOVÁ, M. MINDLOVÁ, P. GIRMAN,
E. DOVOLIOVÁ, L. KARASOVÁ, F. SAUDEK

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Abstract. The existence of an adult PSC that may be used in the treatment of diabetes is still a matter of scientific debate as conclusive evidence of such a stem cell in the adult pancreas has not yet been presented. The main reason why putative PSC has not yet been identified is the lack of specific markers that may be used to isolate and purify them. In order to increase the list of potential PSC markers we have focused on the human pancreatic cells that express cell surface receptor CXCR4, a marker of stem cells derived from different adult tissues. Here we report that CXCR4-positive pancreatic cells express markers of pancreatic endocrine progenitors (neurogenin-3, nestin) and markers of pluripotent stem cells (Oct-4, Nanog, ABCG2, CD133, CD117). Upon *in vitro* differentiation, these cells form ILCC and produce key islet hormones including insulin. Based on our results, we assume that CXCR4 marks pancreatic endocrine progenitors and in combination with other cell surface markers may be used in the attempt to identify and isolate PSC.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic, life-threatening disease characterized by a metabolic disorder in which there is a lack of action or production of insulin. Type 1 DM is caused by an autoimmune reaction leading to the destruction of the insulin-producing β -cells in the pancreas. Current methods of DM treatment are not capable to achieve tight control of blood sugar level

resulting in serious long-term complications, including eye, kidney, nerve and heart disease. Presently, the only approaches to achieving normal glucose control are transplantation of the whole pancreas or transplantation of isolated pancreatic islets (Shapiro et al., 2000; Robertson et al., 2006). This kind of treatment is currently available only for a highly selected group of patients. Whole organ pancreas transplantation is usually performed in diabetic patients with kidney failure who are simultaneously undergoing kidney transplantation (Robertson et al., 2006). A major obstacle to providing whole pancreas or islet transplantation to those in need is the lack of organs as they can only be obtained from cadaver donors. Therefore, the research in the diabetes field has focused on the identification of new sources of insulin-producing tissue.

The embryonic or adult stem cells are considered to be the most promising source of such tissue. Embryonic stem cells (ESC) may seem to be the best material for generating new β -cells as they are pluripotent and can differentiate into any cell of three germ layers including endoderm-derived pancreas. Indeed, some studies have reported generations of insulin-producing cells from ESC (Soria et al., 2000; Lumelsky et al., 2001). However, the insulin content was significantly lower in comparison with mature islet β -cells and when transplanted into animals, ESC-derived cells developed tumours (Fujikawa et al., 2005). In addition, the ESC research and eventual clinical application is hindered by serious ethical concerns.

Since the adult stem cells do not raise such ethical issues, they may be considered as a more suitable source of insulin-producing tissue. Moreover, adult stem cells are partially committed and are supposed to give rise to all cell types of the organ in which they reside. Thus, further manipulation of adult stem cells in an attempt to acquire fully differentiated cells with a mature phenotype would be much easier than in the case of uncommitted ESC.

A large body of evidence supports the assumption that in postnatal life newly formed β -cells are at least partially derived from the pancreatic stem cell. However, conclusive evidence of such a stem cell that can give rise to β -cells in the adult pancreas is still lacking. Pancreatic

Received January 3, 2007. Accepted January 19, 2007.

This work was supported by research grant NR/8031-3/2004 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic.

Corresponding author: František Saudek, Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic. Phone: (+420) 261 364 107, e-mail: frsa@medicon.cz

Abbreviations: DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole; DM – diabetes mellitus; ESC – embryonic stem cell(s); HGF – hepatocyte growth factor; ILCC – islet-like cell cluster; ITS – insulin transferrin selenium; LIF – leukaemia inhibitory factor; MACS – magnetic activated cell sorting; NGN-3 – neurogenin-3; PI – propidium iodide; PSC – pancreatic stem cell(s); RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction; SDF – stromal derived factor; TCSC – tissue-committed stem cell(s).

Folia Biologica (Praha) 53, 13-22 (2007)

stem cells (PSC) are believed to reside within ductal tissue or the islets themselves. The notion that ductal tissue harbours PSC is supported by the mechanism of islet development during organogenesis when new islets arise from pancreatic ducts (Pictet *et al.*, 1972; Edlund, 2002). Indeed, it has been reported in several studies that cultures of mouse and human ductal cells give rise to insulin-producing cells (Bonner-Weir *et al.*, 2000; Ramiya *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003). Similar results have been achieved in studies using islet-derived cells (Lechner *et al.*, 2005). Although the transplantations of these cells were capable to treat diabetic animals in some of the cases, low insulin content and the possible contribution of β cells present in the original islet and ductal tissues may weaken the stem cell character of the applied cells. For instance, simple β -cell replication may explain the reappearance of insulin-producing cells (Dor *et al.*, 2004).

The main reason why a putative pancreatic stem cell has not yet been discovered is the lack of specific markers that could be used to recognize and purify them. Cell surface markers in particular may be very valuable for the attempt to isolate and further study stem cells. One of the few cell surface molecules that are considered as a pancreatic stem cell marker is c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor (HGF) (Suzuki *et al.*, 2004). In addition to other cell surface markers, the c-Met is also expressed in the recently identified human tissue-committed stem cells (TCSC) (Kucia *et al.*, 2004). Another surface molecule that belongs to the family of TCSC markers is CXCR4. The CXCR4 receptor and its ligand, stromal derived factor SDF-1 α , are required for appropriate patterning during ontogeny and stimulate the growth and differentiation of critical cell types. Moreover, CXCR4/SDF-1 α axis is an obligatory component in the maintenance of pancreatic duct cell survival, proliferation, and migration during pancreatic organogenesis and regeneration (Kayali *et al.*, 2003). As noted above, the results of several studies suggest that pancreatic duct epithelium itself serves as a pool for progenitors and PSC that are able to migrate toward the existing or newly forming islets and differentiate into new β -cells. In this case, CXCR4 could play an important role in the process of stem cell differentiation and migration during islet neogenesis.

The aim of our study was to characterize the population of CXCR4-positive human pancreatic cells, their ability to differentiate toward insulin-producing cells and determine whether these cells share the markers of stem cells and pancreatic endocrine progenitors. Here we report that CXCR4-positive cells from the islet-depleted pancreatic fraction express markers of pancreatic endocrine progenitors (neurogenin-3, nestin) and markers of pluripotent stem cells (Oct-4, Nanog, ABCG2, CD133, CD117). Upon *in vitro* differentiation, these cells form islet-like cell clusters (ILCC) that produce key islet hormones and acquire a β -cell like phenotype.

Material and Methods

Tissue preparation

To isolate CXCR4-positive cells, we used human pancreatic acinar tissue that remains after the islet isolation and is discarded. The programme of isolation and transplantation of human pancreatic islets was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer's Teaching Hospital.

Human islets and pancreatic tissue were isolated according to previously described methods (Shapiro *et al.*, 2000). Briefly, islets were isolated from pancreata obtained from 7 donors (mean age 49 ± 18 years, range 29–69). The pancreatic duct was perfused with a cold enzyme mixture containing Liberase HI (Roche, Indianapolis, IN). Tissue was then transferred to a modified Ricordi chamber (Shapiro *et al.*, 2000) and separated by gentle mechanical agitation and enzymatic digestion at 37°C. Islets were purified with the use of continuous gradients of Ficoll-diatrizoic acid in an aphaeresis system (model 2991, Gambro, Pířerov, Czech Republic). The continuous Ficoll gradient was layered before the separation step. The solution densities ranged from 1.064 to 1.092 g/ml with the densest solution at the bottom of density gradient. During centrifugation, islets migrated to the interface between 1.070 and 1.080 g/ml. The remaining cellular material from the denser layer was pooled and further processed.

Cell separation by magnetic activated cell sorting (MACS)

Cellular material obtained from islet isolation (3×10^8 cells) was filtered through a 70- μ m cell strainer to remove residual islets. Filtered tissue suspension was digested with Accutase solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 10 min at 37°C. The single-cell suspension was washed in staining buffer (PBS, 0.5 %HSA, 2 mM EDTA, pH 7.2) and centrifuged at 300 g for 10 min. Cell pellet was resuspended in staining buffer with diluted ($1 \mu\text{g}/10^6$ cells) primary mouse anti-CXCR4 antibody (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 10 min at 4°C. After washing in staining buffer and centrifugation (300 g, 10 min.), the cell pellet was incubated with microbeads conjugated to a monoclonal antibody against primary CXCR4 antibody Rat Anti-Mouse IgG2a+b MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) for 15 min. at 4°C. After the final washing, cells were resuspended in staining buffer and processed in a MidiMACS magnetic separation unit (Miltenyi Biotech) with attached LS column (Miltenyi Biotech). The column was rinsed with cold staining buffer to wash out unlabelled cells. CXCR4-positive cells trapped in the second LS column were eluted after the column had been removed from the magnet field of the MidiMACS separation unit. The purity of cells was determined by immunofluorescence staining using goat anti-CXCR4 antibody (SantaCruz Biotechnology).

Cell culture studies

CXCR4-positive islet-derived pancreatic cells were pre-cultured for the first three days in CMRL 1066 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM Hepes, 10 µl/ml Glutamax-I (Gibco BRL, Paisley, UK) and 2 mmol/l streptozotocin. On the 3rd day after isolation, cells were washed with HBSS (Biocoll, Seattle, WA) and further cultured in serum-free DMEM/F12 expansion medium supplemented with 0.5 % human albumin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml insulin, 5.5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium (ITS) (all Sigma-Aldrich) and 10 µl/ml Glutamax-I (Gibco). To promote cell proliferation, the medium was supplemented with 10 ng/ml of basic fibroblast growth factor (FGF2) and 20 ng/ml epithelial growth factor (EGF) (both Peprotech, Rocky Hill, NJ). To induce differentiation into pancreatic endocrine cells, the medium was supplemented with 100 pM exendin-4, 10 nM nicotinamide (both Sigma-Aldrich), 2 nM activin-A, 10 pM

HGF and 2 nM LIF (all Peprotech), and cultured for one week.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA (from approximately 10⁶ cells and 10⁵ cells in case of ILC) was isolated using Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and treated with DNase using RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA was isolated from approximately 1x10⁶ cells and 10⁵ cells in case of ILCC. Isolated RNA (2 µg) was reverse transcribed with Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen). Total RNA from the islet fraction was used as positive control. Gene-specific primer pairs, annealing temperatures, and product sizes are listed in Table 1. All of the primers span at least one of the introns and most of them are designed to span the intron/exon boundary. PCR products were separated and visualized on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Table 1. Sequences of specific primer pairs employed for RT-PCR

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature	Product length
Insulin	ccatcaagcacatcactgtcc	ccatctctctcggtgcagg	61	414
PDX-1	cttggtctcctccggtcc	cttgctctcctcttttccac	61	202
Glucagon	gcgagatttccagaagagg	agcaggtgatgttggaagatg	61	198
GLP-1 Receptor	tggcattgggtgaacttc	caggcgtggagtctcagc	61	462
Neurogenin-3	tctattctttgcccggtag	agtccaactcgtcttagg	61	256
NeuroD/BETA2	aggaattcggccacgcag	gtctcttgggctttgatcgtc	61	346
Isl1-1	ggagcaactgtagagatgacg	agtactttccaagggtggctgg	61	245
Nkx2.2	ctacgacagcagcgacaacc	gccttggagaaaagcactcg	61	219
Nkx6.1	gctctacttcagccccagc	ggaaccagacctgacctgac	61	332
OCT-4iso1	agctggagaaggagaagctgg	tcggaccacatccttctcgag	61	458
OCT-4iso2	ggggagattgataactggtgtg	tcggaccacatccttctcgag	61	480
ABCG2	gatattgatttacggctttgc	aaggccacgtgattcttc	61	175
Nanog	gcaacaacccactctctgc	aggccttctcgctcacac	61	288
Glut2	cactgctgtctgtattctgtg	aaactcagccaccatgaacc	61	223
Pax4	actccagtgctcctccatc	ggaaaaccagaccctcacc	61	298
Pax6	gccctggagaagagtttgag	gcgctgtagggtgttgtagg	61	314
HNF3beta	tggagcagctactatgcagagc	atggagttcatgttgccgtag	61	356
HNF6	cgcaggtcagcaatggaag	gatgagttgcctgaattggag	61	535
HLXB-9	taagatccccgacttcaactcc	caaatcttcacctgggtctcg	61	192
LIFR	cttgcgagcctatacagatgg	ctgctccctcacagacactc	61	249
HGF-R	agtgaagtggatggctttgg	gggcagtattcgggtgttag	61	162
CD117	agatgctcaagccgagtgc	actatcgtcgcaggaagactcc	61	284
CD133	tcttctcatggttgagttgg	ttaccagtctgagccaagtagc	61	478
GAPDH	ggagtcaacggatttggctc	catgggtggaatcatattggaac	61	142
SOX17	cagaatccagacctgcacaac	ctgctcggggaactggag	61	294

Immunocytochemistry

MACS-separated cell suspension was washed with PBS and then centrifuged onto microscope slides at 55 g for 10 min. Cytospin slides were fixed in 4% PFA for 15 min and rinsed in PBS before staining.

ILCL were washed with PBS, fixed for 15 min in 4% PFA, rinsed with PBS, suspended in a 2% agarose-PBS solution and centrifuged at 100 g for 3 min to form compact pellets. After overnight submersion in 30% sucrose, ILCC were embedded in OCT mounting medium (TissueTek, Bayer Corp, Pittsburgh, PA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

After several washes in PBS, 8- μm sections of frozen ILCC or fixed cytopsin slides were incubated in blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) in 0.2% Triton X-100, 0.1 M glycine (Sigma-Aldrich) and PBS for 1 h at room temperature to prevent unspecific binding. Incubation with primary antibodies in appropriate dilution was performed in a blocking solution for 1 h at 37°C . The following primary antibodies were used at the following dilutions: goat anti-CXCR4, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), mouse anti-CXCR4, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), goat anti-nestin, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), rabbit anti-LIFR, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), goat anti-glucagon, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), rabbit anti-insulin, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), mouse anti-human C-peptide 1 : 200 (ExBio, Czech Republic). After intensive washing with PBS, sections were incubated with the specific secondary antibody diluted in the blocking solution for 1 h at 37°C . The secondary antibodies were: Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG, Alexa fluor 546, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (all from Molecular Probe, Eugene, OR). 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at a concentration 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used to label the nuclei for 10 min at 37°C . After rinsing with PBS, sections were mounted with antifade solution and examined with a fluorescence microscope (Model BX 41, Olympus, Japan).

C-peptide cell content

Cell protein extract was isolated using AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen). Human C-peptide was determined using a C-peptide IRMA kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) according to the manufacturer's instructions.

Results

Pancreatic tissue obtained after islet isolation from human pancreata ($N = 7$) was filtered through a strainer to remove any remaining islets. Dithisone staining of tissue samples confirmed the absence of pancreatic islets, which typically stain red due to their zinc content. Cellular material was further dissociated to obtain single-cell suspension. The ratio of β -cells present

within the cell suspension was assessed by immunofluorescence detection of C-peptide-positive cells and was as low as $0.04 \pm \text{SD } 0.02\%$ (Fig. 1D).

CXCR4-positive cells represented $22.1 \pm 6.6\%$ of all cells processed by MACS. The purity of cell fractions revealed by immunostaining was more than 90% in the case of CXCR4-positive as well as -negative fractions (Fig. 1A). Slight contamination of both fractions by β -cells was confirmed by RT-PCR (Fig. 2). The expression of transcription factors involved in pancreatic endocrine cell differentiation (Pdx1, NeuroD1, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1 and HNF-3 β) was also detected in both fractions (Fig. 2). Detection of these transcription factors could be caused by the presence of mature β -cells; however, other cell types could also express some of these transcription factors. In particular, the detection of the neurogenin-3 mRNA within CXCR4-positive cell population (Fig. 2) reveals the presence of pancreatic endocrine progenitors. Neurogenin-3 was also expressed in the islet cell fraction (Fig. 2).

Immunostaining for nestin, a putative marker of PSC, showed some positive cells in the CXCR4 cell fraction (Fig. 1B). Positive staining for leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR) (Fig. 1C), another cell surface marker of TCSC, is in accordance with RT-PCR detection (Fig. 2). RT-PCR analysis further revealed the expression of several markers of pluripotent and adult stem cells, including transcription factors Oct4 and Nanog, and cell surface receptors CD117, CD133, and ABCG2.

To explore the potential of CXCR4-positive cells to differentiate toward islet endocrine cells we have decided to deplete contaminating β -cells. The objective of this step was to exclude the possible contribution of β -cells that could proliferate or re-differentiate during further culturing. After three days of cultivation in a medium containing streptozotocin and a subsequent 10 days of cultivation in a serum-free medium no insulin-positive cells were detected either by immunofluorescence or by RT-PCR.

The initial 3-day cultivation was accompanied with extensive cell apoptosis and necrosis that resulted in a $62.4 \pm 8.2\%$ reduction in the total cell number. During the 10-day culture in a serum-free medium, β FGF and EGF growth factors, which are known for their beneficial effects on proliferation of precursors, were added. The rate of cell apoptosis determined by PI staining had decreased to $8.7 \pm 2.1\%$ (data not shown). Concomitantly, there was an increase in the number of cells that reached $92.1 \pm 15.1\%$ of the original cell number. During cultivation, most of the cells were attached to the surface of the flask and possessed an epithelial-like, round morphology (Fig. 3A, B). The cell population obtained after cultivation in the serum-free medium no longer expressed insulin, glucagon, and somatostatin. On the other hand, the expression of

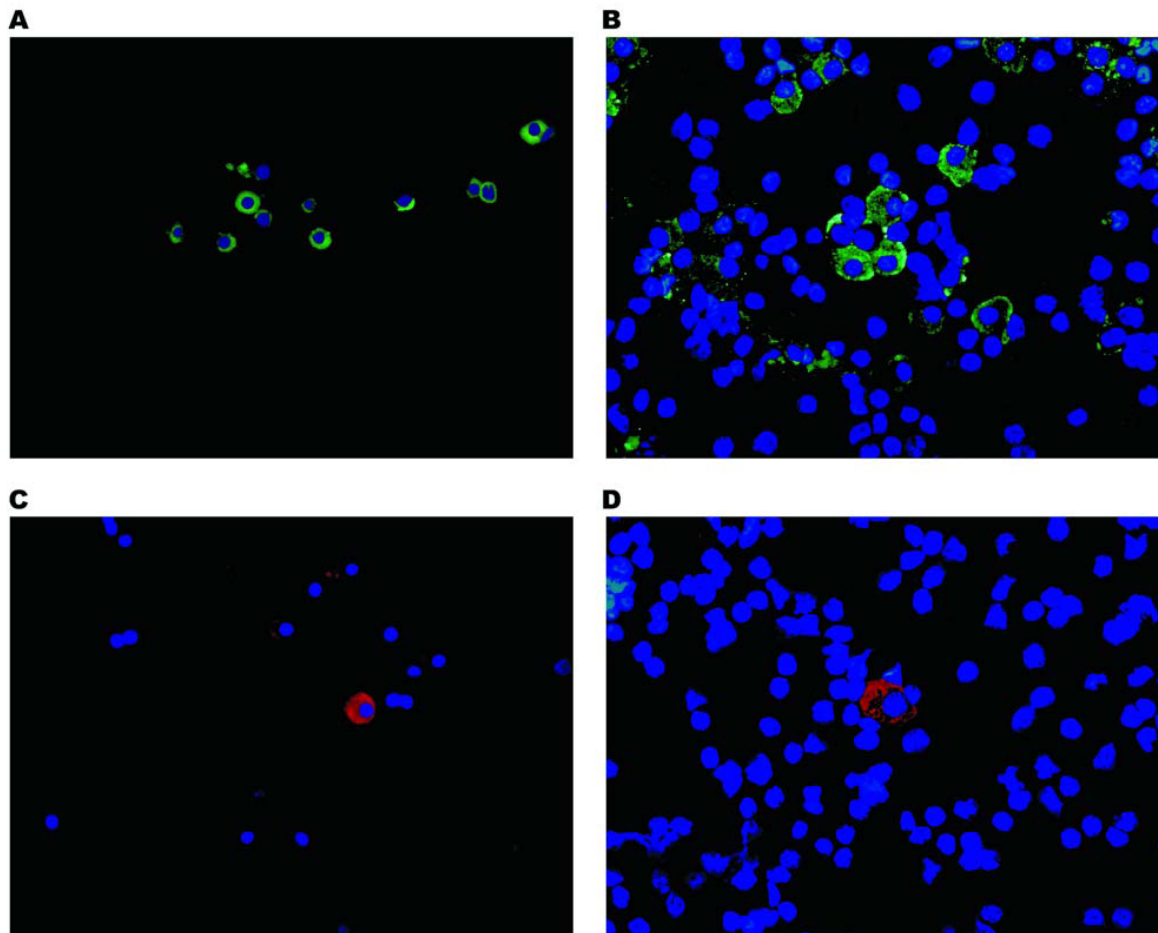


Fig. 1. Immunofluorescence detection of CXCR4 (A), nestin (B), LIFR (C) and insulin (D) in CXCR4 positive cells. All nuclei in A-D are stained blue with DAPI.

Pdx1, Nkx6.1, NeuroD1, Pax6, Isl1 and ngn-3 was still observed (Fig. 4).

Afterwards, cells were seeded at a high density in a medium supplemented with exendin-4, nicotinamide, activin-A, HGF and LIF, supplements that have been reported to support differentiation of insulin-producing cells. Two days after the initial seeding, some of the cells began to form colonies (Fig. 3C) that gave rise to the ILCC (Fig. 3D-F). The first ILCC were observed after four days of culturing in a differentiation medium (Fig. 3D). Within seven days, 108 ± 28 ILCC had formed from 5×10^6 cells. The average size of ILCC was $134 \pm 87 \mu\text{m}$ and one of the ILCC contained 1231 ± 574 cells.

Differentiation of cells was associated with the expression of key pancreatic hormones insulin glucagon and somatostatin as well as transcription factors of endocrine differentiation (Fig. 4). The expression of preproinsulin and glucagon by ILCC was confirmed by immunostaining for both of these hormones (Fig. 5A). The proportion of ILCC C-peptide-

positive cells ($5.8 \pm 1.1 \%$) was significantly lower than the number of glucagon-positive cells (13.3 ± 2.8) (Fig. 5B). C-peptide protein content was $0.38 \pm 0.11 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ of total protein as determined by radioimmunoassay of ILCC cellular extracts. One of the most intriguing findings was almost homogenous staining for nestin in most of the ILCC cells (Fig. 5A). Within ILCC cells, CXCR4-positive cells were also detected (Fig. 5B).

Discussion

Here we report that the population of CXCR4-positive pancreatic cells contains endocrine progenitors that are able to give rise to different endocrine cells bearing characteristics of differentiated islet cells (β -cells, α -cells, δ -cells). Upon differentiation, CXCR4-positive cells isolated from non-endocrine pancreatic tissue form islet-like cell clusters that produce islet hormones such as insulin, glucagon, and somatostatin. In addition, we have shown that cells expressing markers of pluripotent and tissue-committed stem cells are present

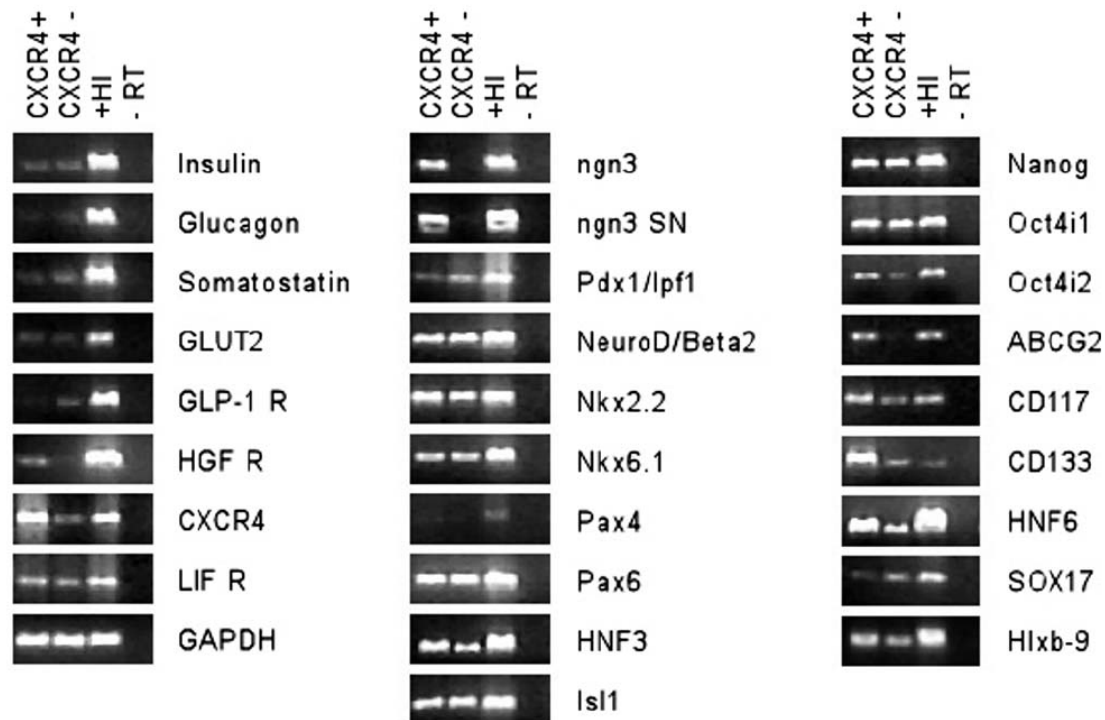


Fig. 2. RT-PCR analysis of gene expression in CXCR4-positive (CXCR4+) and CXCR4-negative (CXCR4-) cells. Transcripts were analysed with the indicated primers, in comparison with a negative control (-RT) and a positive control (+HI, human islet RNA).

within the pancreatic non-endocrine tissue. These cells may represent the source of newly formed endocrine progenitors as well as differentiated islet endocrine cells.

In an attempt to identify a pancreatic endocrine progenitor and a stem cell, we have employed genetic markers that are involved in the development of endocrine pancreas and β -cell neogenesis. Among the best defined and studied markers are transcription factors that regulate gene expression during the differentiation process. Unfortunately, most of the transcription factors involved in β -cell differentiation could not be used as exclusive markers of endocrine progenitors since they are also expressed by mature endocrine cells and other pancreatic cell types (Edlund, 2002; Murtaugh *et al.*, 2003). So far, the basic helix-loop-helix transcription factor neurogenin-3 (ngn-3) represents the only exception of this unfavourable rule.

The expression of ngn-3 is only transient. ngn-3 is exclusively expressed in islet cell progenitors and not in differentiated islet cells (Schwitzgebel *et al.*, 2000). In rodents, ngn-3-positive cells give rise to all four endocrine cell types not only during embryogenesis, but

also in postnatal life (Gu *et al.*, 2002). In adult human pancreas ngn-3 expression was recently revealed only in islets (Lechner *et al.*, 2005). It has led to the assumption that progenitor/stem cells exist only within islets, an idea supported by a few animal studies (Gu *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2005). On the other hand, our finding that ngn-3-positive cells are present within adult non-endocrine tissue as well as in islets supports the hypothesis that newly formed β -cells bud from pancreatic ducts. Our result is in accordance with a study that employed a highly sensitive immunostaining method (Wang *et al.*, 2005). In this study, ngn-3-positive cells were not only detected in islets of adult pancreas, but were also observed in duct-like cells of diabetes-prone rats. The discrepancy between these results and those obtained in earlier studies may stem from different immunostaining techniques and primers used for the detection of ngn-3 and its expression.

The expression of ngn-3 was more abundant in the CXCR4-positive cells in comparison with the CXCR4-negative population. Thus, it may be assumed that the CXCR4 receptor serves as a marker of pancreatic endocrine progenitors.

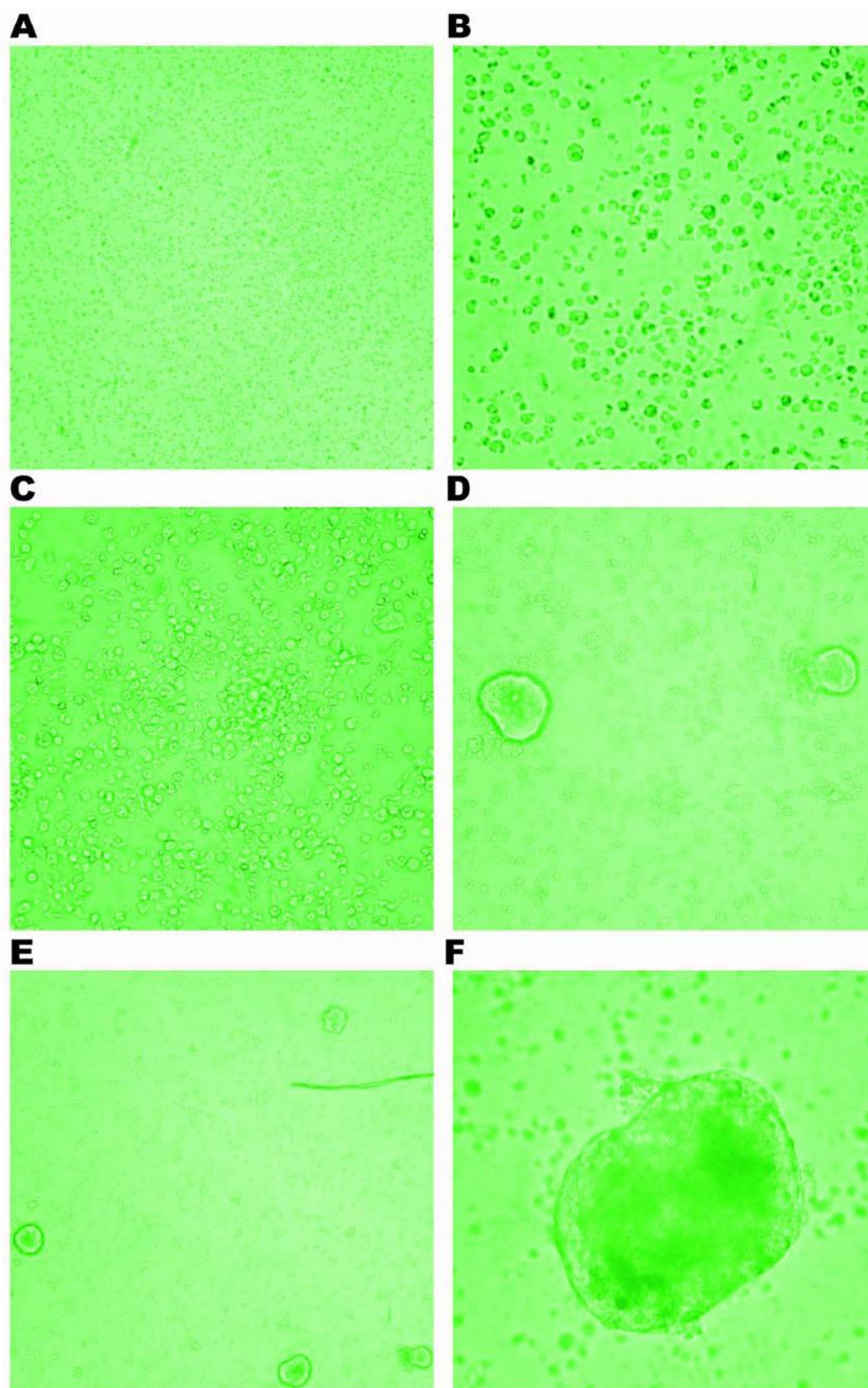


Fig. 3. Phase contrast images of: (A) cell suspension derived from CXCR4-positive cells, (B) 3x magnification of A, (C) forming cell clusters, (D-E) ILCC buds appear 4 days after the initiation of differentiation, (F) some of the ILCC attain a diameter of more than 200 μm.

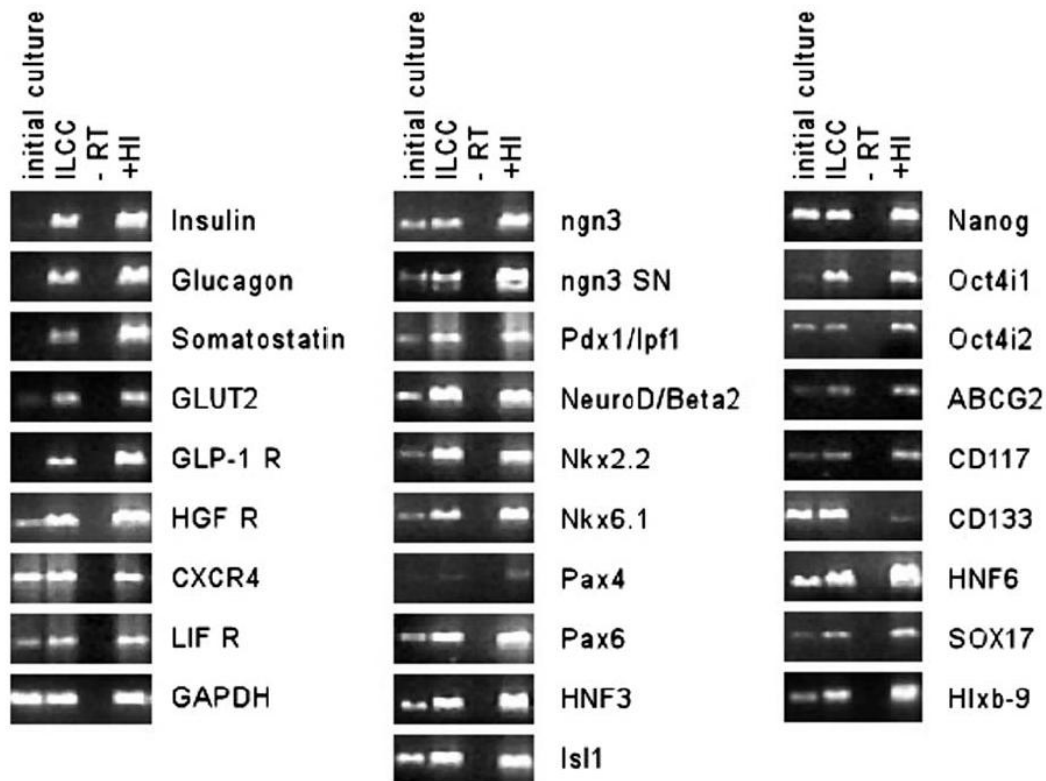


Fig. 4. RT-PCR analysis of gene expression in ILCC and initial culture prior to differentiation into ILCC. Transcripts were analysed with the indicated primers, in comparison with a negative control (-RT) and a positive control (+HI, human islet RNA).

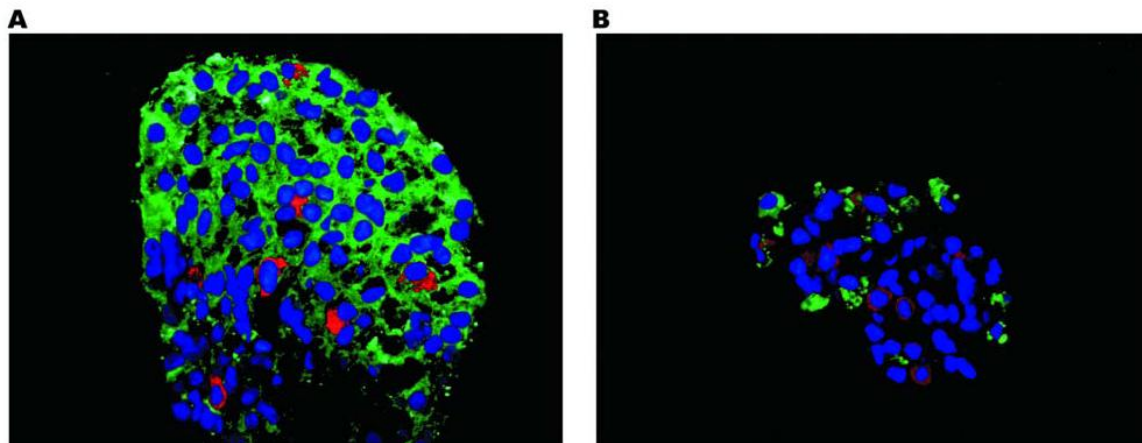


Fig. 5. Immunofluorescence double staining of C-peptide (red) and nestin (green) in ILCC (A), glucagon (green) and CXCR4 (red) in ILCC (B). All nuclei in panels A and B are stained blue with DAPI.

Based on this finding we wanted to determine whether the CXCR4-positive cell population also contains more primitive cells with stem cell characteristics. We have focused on the markers that are expressed by the pluripotent stem cells and TCSC. RT-PCR analysis

revealed the expression of several markers of pluripotent stem cells including transcription factors Oct4 and Nanog that are required to maintain the pluripotency of embryonic cells (Cauffman *et al.*, 2006), and markers of adult stem cells (Zhou *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002;

Wang et al., 2004) such as receptor for stem cell factor CD117, cell surface receptor CD133, and the side population stem cell marker ABCG2.

The potential of CXCR4-positive cells that give rise to insulin-producing cells was tested by *in vitro* culture stimulated by selected growth factors and nutrients. Although the total number of insulin-positive cells within newly formed ILCC was significantly lower in comparison with native islets, the number of glucagon-positive cells was almost the same as in freshly isolated islets. It could have been caused by the culture medium used during differentiation. Our selection of growth factors and supplements could prefer α -cell differentiation of endocrine progenitors at the expense of β -cell differentiation.

Another interesting finding is that almost all the cells in ILCC were positive for nestin. Nestin is thought to be a marker of PSC that is expressed during differentiation of insulin-producing cells. Although the role of nestin as a marker of PSC has been disputed (Selander et al., 2002; Treutelaar et al., 2003), most of the studies addressing the expression of nestin during β -cell differentiation supports the conclusion that nestin marks PCS (Wang et al., 2005; Eberhardt et al. 2006). With a low proportion of hormone-positive cells within ILCC and the high number of nestin-positive cells we may assume that some hormone-negative progenitors or stem cells were still present within ILCC. This assumption is supported by the results of the RT-PCR that demonstrated the expression of *ngn-3* and stem cell markers.

Although the formation of ILCC from pancreatic tissue has already been presented by other authors (Bonner-Weir et al., 2000; Ramiya et al. 2000; Gao et al., 2003; Wang et al., 2004; Lechner et al., 2005), our group is the first to describe the derivation of ILCC from CXCR4-positive pancreatic cells.

However, the mechanism of the differentiation of our ILCC could be explained by different means. In addition to the differentiation from stem cells, new β -cells could be derived by trans-differentiation from other pancreatic and even non-pancreatic cell types, which could have happened in our case as we used mainly acinar and ductal tissue. Another possible explanation could be de-differentiation of mature β -cells into a more primitive cell type such as progenitor or stem cells and their further re-differentiation into insulin-producing cells. However, the low β -cell number in the original sample does not necessarily support this explanation.

The formation of ILCC from the different cell types was described by many authors (Bonner-Weir et al., 2000; Ramiya et al. 2000; Gao et al., 2003; Lechner et al., 2005); however, only some of these experiments were successfully reproduced. In some of the cases, the detected insulin could be absorbed by cells from the culture medium which contained insulin supplements (Rajagopal, 2003; Hansson et al., 2004). In our study,

for insulin production we employed the detection of C-peptide that is not added to the medium. C-peptide is a part of the pro-insulin peptide that is produced by β -cells and later separated into mature insulin and C-peptide.

The origin of newly formed β -cells in postnatal life still remains unclear. Although a large body of evidence supports the assumption that newly formed β cells are derived from PSC, the conclusive evidence of such specific stem cell type in the adult pancreas has not yet been presented. In our study, we have shown one possible source of β cells that could be easily obtained and, upon *in vitro* differentiation, give rise to insulin-producing cells. In future research, we will focus on the potential of these cells to produce insulin *in vivo* and possibly treat diabetic animals.

References

- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarkiewicz, K., Song, K. H., Sharma A., O'Neil, J. J. (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7999-8004.
- Cauffman, G., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Van de Velde, H. (2006) POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* **24**, 2685-2691.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., Melton, D. A. (2004) Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-46.
- Eberhardt, M., Salmon, P., von Mach, M. A., Hengstler, J. G., Brulport, M., Linscheid, P., Seboek, D., Oberholzer, J., Barbero, A., Martin, I., Muller, B., Trono, D., Zulewski, H. (2006) Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1167-1176.
- Edlund, H. (2002) Pancreatic organogenesis – developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 524-532.
- Fujikawa, T., Oh, S. H., Pi, L., Hatch, H. M., Shupe, T., Petersen, B. E. (2005) Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am. J. Pathol.* **166**, 1781-1791.
- Gao, R., Ustinov, J., Pulkkinen, M. A., Lundin, K., Korsgren, O., Otonkoski, T. (2003) Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* **52**, 2007-2015.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D. A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447-2457.
- Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., Melton, D., Semb, H., Serup, P. (2004) Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* **53**, 2603-2609.
- Kayali, A. G., Van Gunst, K., Campbell, I. L., Stotland, A., Kritzik, M., Liu, G., Flodstrom-Tullberg, M., Zhang, Y. Q., Sarvetnick, N. (2003) The stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor

- survival and migration in the pancreas. *J. Cell Biol.* **163**, 859-869.
- Kodama, S., Toyonaga, T., Kondo, T., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Kawashima, J., Goto, H., Kume, K., Kume, S., Sakakida, M., Araki, E. (2005) Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during β cell regeneration in STZ-treated mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 1170-1178.
- Kucia, M., Ratajczak, J., Reca, R., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M. Z. (2004) Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol. Dis.* **32**, 52-57.
- Lechner, A., Nolan, A. L., Blacken, R. A., Habener, J. F. (2005) Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 581-588.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**, 1389-1394.
- Murtaugh, L. C., Melton, D. A. (2003) Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**, 71-89.
- Pictet, R. L., Clark, W. R., Williams, R. H., Rutter, W. J. (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev. Biol.* **29**, 436-467.
- Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B., Cornelius, J. G. (2000) Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* **6**, 278-282.
- Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I., Melton, D. A. (2003) Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* **299**, 363.
- Robertson, R. P., Davis, C., Larsen, J., Stratta, R., Sutherland, D. E., American Diabetes Association. (2006) Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 935.
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D., German, M. S. (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**, 3533-3542.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbutt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Rajotte, R. V. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* **343**, 230-238.
- Selander, L., Edlund, H. (2002) Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech. Dev.* **113**, 189-192.
- Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J. A., Martin F. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162.
- Suzuki, A., Nakauchi, H., Taniguchi, H. (2004) Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* **53**, 2143-2152.
- Treutelaar, M. K., Skidmore, J. M., Dias-Leme, C. L., Hara, M., Zhang, L., Simeone, D., Martin, D. M., Burant, C. F. (2003) Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* **52**, 2503-2512.
- Yu, Y., Flint, A., Dvorin, E. L., Bischoff, J. (2002) AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J. Biol. Chem.* **277**, 20711-20716.
- Wang, G. S., Rosenberg, L., Scott, F. W. (2005) Tubular complexes as a source for islet neogenesis in the pancreas of diabetes-prone BB rats. *Lab. Invest.* **85**, 675-688.
- Wang, R., Li, J., Yashpal, N. (2004) Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from post-natal rat pancreatic islets. *J. Endocrinol.* **182**, 113-122.
- Wang, R., Li, J., Yashpal, N., Gao, N. (2005) Nestin expression and clonal analysis of islet-derived epithelial monolayers: insight into nestin-expressing cell heterogeneity and differentiation potential. *J. Endocrinol.* **184**, 329-339.
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., Sorrentino, B. P. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7**, 1028-1034.
- Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., Habener, J. F. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**, 521-533.

**KIDNEY RETRANSPLANTATION FOLLOWING GRAFT LOSS TO
POLYOMA VIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY: AN EFFECTIVE
TREATMENT OPTION IN SIMULTANEOUS PANCREAS AND KIDNEY
TRANSPLANT RECIPIENTS**

Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K,
Adamec M, Hirsch HH

Transpl Int. 2008 Apr;21(4):353-6

www.transplantinternational.com

Transplant International

Transplant International

Official Journal of the European Society for Organ Transplantation,
the European Liver and Intestine Transplant Association and
the German Transplantation Society

www.transplantinternational.com

Transplant International

Transplant International

Official Journal of the European Society for Organ Transplantation,
the European Liver and Intestine Transplant Association and the German Transplantation Society

Volume 21, Issue 4, April 2008

Contents

Reviews

- 293 Immune responsiveness and protective immunity after transplantation
S. Gangappa, K. E. Kokko, L. M. Carlson, T. Gourley, K. A. Newell, T. C. Pearson, R. Ahmed & C. P. Larsen
- 304 The renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: pros and cons
J. M. Cruzado, J. Rico & J. M. Grinyó

Clinical Research

- 314 Pulmonary hemodynamics as predictors of mortality in patients awaiting lung transplantation
N. Selimovic, B. Andersson, C.-H. Bergh, G. Mårtensson, F. Nilsson, O. Bech-Hanssen & B. Rundqvist
- 320 Nonsurgical policy for treatment of bilioenteric anastomotic stricture after living donor liver transplantation
A. Mita, Y. Hashikura, Y. Masuda, Y. Ohno, K. Urata, Y. Nakazawa, T. Ikegami, M. Terada, H. Yamamoto & S.-i. Miyagawa
- 328 Screening for sickle trait among potential live kidney donors: policies and practices in US transplant centers
P. P. Reese, A. C. Hoo & C. C. Magee
- 332 Biliary complications in right lateral sector graft live donor liver transplantation
Y. Kyoden, S. Tamura, Y. Sugawara, N. Akamatsu, Y. Matsui, J. Togashi, J. Kaneko & M. Makuuchi
- 340 Transplant recipient renal function is donor renal mass- and recipient gender-dependent
S. C. Jacobs, J. M. Nogueira, M. W. Phelan, S. T. Bartlett & M. Cooper
- 346 Hepatitis B virus vaccine switch program for prevention of *de novo* hepatitis B virus infection in pediatric patients
J. B. Park, C. H. D. Kwon, K.-W. Lee, G.-S. Choi, D.-J. Kim, J.-M. Seo, S.-J. Kim, J.-W. Joh & S.-K. Lee
- 353 Kidney retransplantation following graft loss to polyoma virus-associated nephropathy: an effective treatment option in simultaneous pancreas and kidney transplant recipients
M. Mindlova, P. Boucek, F. Saudek, T. Jedinakova, L. Voska, E. Honsova, K. Lipar, M. Adamec & H. H. Hirsch
- 357 Impact of smoking on progression of vascular diseases and patient survival in type-1 diabetic patients after simultaneous kidney-pancreas transplantation in a single centre
G. Biesenbach, P. Biesenbach, G. Bodlaj, H. Pieringer, B. Schmekal, O. Janko & R. Margreiter

Experimental Research

- 364 Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat
H. Chen, B. Xing, X. Liu, B. Zhan, J. Zhou, H. Zhu & Z. Chen
- 372 Adenoviral cardiotrophin-1 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat small-for-size liver transplantation model
J. Song, Y.-W. Zhang, A.-H. Yao, Y. Yu, Z.-Y. Pu, G.-Q. Li, X.-C. Li, F. Zhang, G.-Q. Sheng & X.-H. Wang

Case Report

- 384 Left lobe living donor liver transplantation in an adult patient with situs inversus: technical considerations
Y. Soejima, M. Meguro, A. Taketomi, T. Ikegami, Y. Yamashita, N. Harada, S. Ito, H. Uchiyama, T. Yoshizumi & Y. Maehara

Letters to the Editors

- 390 Treatment of central pontine myelinolysis with plasmapheresis and immunoglobulins in liver transplant patient
F. H. Saner, S. Koeppen, M. Meyer, M. Kohnle, S. Herget-Rosenthal, G. C. Sotiropoulos, A. Paul, A. Radtke, M. Malago & C. E. Broelsch
- 392 Do we have the same clinical results with Neoral® and Equoral® treatment in kidney transplant recipients? A pilot study
G. Spasovski, J. Masin-Spasovska & N. Ivanovski
- 395 Multi-locular thymic cysts after acute pancreatitis in a liver transplant recipient
L. Coletti, P. De Simone, G. Catalano, C. Spinelli, P. Carrai, U. Montin, L. Urbani, A. De Liperi, G. Biancifiore, F. Falaschi & F. Filippini
- 397 Successful treatment of Evans syndrome post liver transplant with splenectomy and switch from tacrolimus to cyclosporine
C. Domenech, V. Mialou, C. Galambrun, A. Lachaux, P.Y. Mure, F. Dijoud & Y. Bertrand
- 400 Announcements

This journal is available online at Blackwell Synergy.
Visit www.blackwell-synergy.com to search the articles
and register for table of contents e-mail alerts.

ORIGINAL ARTICLE

Kidney retransplantation following graft loss to polyoma virus-associated nephropathy: an effective treatment option in simultaneous pancreas and kidney transplant recipients

Martina Mindlova,¹ Petr Boucek,¹ Frantisek Saudek,¹ Teodora Jedinakova,¹ Ludek Voska,² Eva Honsova,² Kvetoslav Lipar,³ Milos Adamec³ and Hans H. Hirsch⁴

¹ Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

² Department of Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³ Transplant Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁴ Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology, Basel, Switzerland

Keywords

kidney retransplantation, polyomavirus-associated nephropathy, simultaneous pancreas and kidney transplantation.

Correspondence

Petr Boucek MD, Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 9, Prague 4, 14021, Czech Republic. Tel.: +420 261366024; fax: +420 261362820; e-mail: petr.boucek@ikem.cz

Received: 9 October 2007

Revision requested: 10 November 2007

Accepted: 28 November 2007

doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00620.x

Summary

Polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) has emerged as an important cause of graft loss following kidney transplantation. Experience with kidney retransplantation (reKT) in PVAN is very limited, especially in the setting of uninterrupted immunosuppression protecting the still functioning pancreatic graft after simultaneous pancreas/kidney transplantation (SPK). We present a review of five cases of reKT in four SPK recipients with Type 1 diabetes mellitus from a single centre (a second reKT was performed in one patient following first reKT failure due PVAN recurrence). Pre-emptive nephrectomy of the failed graft was performed in three of the cases and all kidney grafts for reKT were harvested from cadaveric donors. All patients are dialysis- and insulin-independent at 30 (9–55), median (range), months following last reKT with maintenance immunosuppression consisting of tacrolimus/sirolimus in three and cyclosporine A/mycophenolate mofetil in one patient. In conclusion, reKT represents an effective treatment option in SPK patients with kidney failure on account of PVAN. Use of interventions designed to reduce active viral replication, including pre-emptive nephrectomy of the failed graft, should be considered before reKT.

Introduction

Polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) has become an important problem in renal transplantation affecting 1–10% of patients [1]. Since no specific treatment of proven efficacy is available, the primary mode of intervention consists of modification and/or reduction of immunosuppressive therapy. Still, many cases of PVAN are diagnosed in an advanced stage with allograft dysfunction (PVAN B, diffuse interstitial nephritis). Such cases are associated with an almost 50% rate of graft loss which increases to over 90% in stage PVAN C (tubular atrophy and interstitial fibrosis) [2].

Kidney retransplantation (reKT) represents a possible treatment option following graft failure but limited experience published so far consists of descriptions of individual cases with several questions related to this procedure remaining unsettled [3,4]. These include the need for pre-emptive graft nephrectomy and the role of temporary discontinuation of immunosuppression to reduce viral loads and to eliminate a possible re-infection source as well as the switch to a different immunosuppressive regimen following retransplantation.

These questions may be even more relevant in the cases of PVAN in the setting of combined kidney/pancreas transplants (SPK) where the unaffected function

of the pancreatic graft mandates the continuation of some form of immunosuppressive treatment even after kidney graft failure. However, only very limited information on PVAN in SPK is available [5–7]. In a single-centre report, PVAN was the leading cause of kidney graft loss in the first 2 years after SPK [5]. This notion was however challenged in another retrospective analysis [6]. In this report we describe our experience with reKT in four SPK patients with kidney allograft loss on account of PVAN.

Methods

A retrospective review of five reKT in four Type 1 diabetic patients [M/F 2/2, aged median (range) 36 (27–52) years, with duration of diabetes 22 (17–26) years] after a successful SPK at the Institute for Clinical and Experimental Medicine (1999–2002).

The demographic and clinical characteristics of the first transplants and retransplants are presented in Tables 1 and 2, respectively.

Results

Polyomavirus-associated nephropathy was biopsy-proven at 20 (8–22) months after SPK and was classified in most cases as stage B [1]. Despite modifications of immunosuppression in all patients (dose reduction, switchover from mycophenolate mofetil to sirolimus in one case and switchover from cyclosporine A to azathioprine in another patient) and cidofovir treatment in one (40–0.54 mg/kg BW – every 2 weeks), graft failure occurred in all patients at 29 (23–39) months after SPK and 13 (1–23) months after diagnosis of PVAN. No changes in the function of the pancreatic grafts were noticed and all patients remained insulin-independent.

All patients underwent reKT at 36 (27–63) months after SPK. Patients 1 and 4 were retransplanted before losing their graft function with graft nephrectomy performed at the time of reKT. In patients 2 and 3, a pre-emptive nephrectomy was done during dialysis treatment at 9 and 18 months before reKT.

In patient 1, PVAN recurred at 6 months and graft failure occurred at 1 year after first reKT despite changes in immunosuppression (tacrolimus reduced, MMF switched to sirolimus, prednisone discontinued). Following a period of dialysis and a pre-emptive nephrectomy of the second kidney graft, a second reKT was performed (Table 1).

All patients are currently dialysis- and insulin-independent (30/09/2007). Clinical and laboratory features of reKT are presented in Table 2. The follow-up duration is 30 (9–55) months from the last reKT. Maintenance

immunosuppression consists in most cases of the combination of tacrolimus/sirolimus; patient 1 is being treated by cyclosporine A/mycophenolate mofetil. Patient 4 has low-level plasma and high-level urine BK virus (BKV) replication; other patients are BKV DNA negative.

Discussion

Kidney retransplantation following previous allograft failure on account of PVAN is primarily confronted with the potential risk of its recurrence. However, recurrence was not frequent in reports published so far (affecting just two of 15 patients) although it may be higher than the occurrence of PVAN in primary transplants [4].

As suggested recently in the recommendations of an international expert panel [1], absence of polyomavirus replication should be confirmed prior to reKT. Reduction or discontinuation of immunosuppression, administration of antiviral drugs or pre-emptive allograft ureteronephrectomy may be tried in this respect. The latter should be certainly considered in SPK cases, where neither major reduction nor termination of immunosuppressive therapy after kidney graft failure on account of PVAN is possible. The risks of an additional surgical procedure may be offset by the rapid disappearance of viral plasma loads following graft nephrectomy with fast or moderately fast clearance rates independent of continued immunosuppressive regimes [8]. Although a decrease of plasma viral loads is achievable by the reduction of immunosuppression alone, active long-term surveillance of the level of viraemia is probably indispensable in such cases.

On the other hand Womer *et al.* [9] recently reported on two patients (with SPK as the primary transplant procedure in one case) who underwent a successful pre-emptive living-donor reKT despite active viraemia. Absence of PVAN recurrence and continuation of stable graft function were observed after 21 and 12 months of follow-up. In the opinion of the authors, this approach was justified to prevent the detrimental effects of time on dialysis on patient and graft survival. Living donor transplantation with less peri-operative damage of the graft, lower rates of acute rejection and generally better HLA-matching was also considered to carry a lower risk of PVAN recurrence than cadaveric donor transplants. Screening of living kidney donors for BKV infection before retransplantation could be also performed.

Though duration of follow-up in one case is probably insufficient to exclude reliably a PVAN relapse, data from our centre represent the most extensive experience in SPK recipients from a single centre published so far. In our

Table 1. Demographic and clinical characteristics of SPK patients with PVAN.

Patient No.	Gender	Duration of diabetes (years)	Age at the time of SPK (years)	Initial IS	Rejection treatment	Time from SPK to PVAN diagnosis (months)	Stage of PVAN at the time of diagnosis	PVAN treatment	Time from PVAN diagnosis to graft failure or reKT (months)	Time on dialysis (months)	Pre-emptive NE (months before reKT)	Time to reKT (months)
1 (SPK)	M	21	35	Tac, MMF	3.75 g MP	21	B	Red of IS	6	0	0	27
1 (1st reKT)	-	-	-	Tac, MMF, prednisone	1.5 g MP	6	B	Switch MMF/Siro, Red Tac, Disc, prednisone	6	25	15	37
2	F	23	52	Tac, Siro	0	22	A	Red of IS	1	17	9	40
3	M	26	37	CSA, MMF	0.5 g MP, 1.8 g ATG	20	B	Switch MMF/Siro, CSA/Aza, Azaprednisone, ciclosporin	19	24	18	63
4	F	17	27	Tac, MMF	0	8	B	Red of IS	23	0	0	31
Median (range)		22 (17-26)	36 (27-52)		0	21 (8-22)*			13 (1-23)*			36 (27-63)*

SPK, simultaneous pancreas/kidney transplantation; PVAN, polyomavirus-associated nephropathy; MP, methylprednisolone; ATG, antithymocyte globulin; Tac, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; CSA, cyclosporine A; Aza, azathioprine; Siro, sirolimus; IS, immunosuppression; Red, reduction; Disc, discontinuation; NE, nephrectomy; reKT, kidney retransplantation.

*Time periods following first reKT in patient 1 not included.

Table 2. Clinical and laboratory features of kidney retransplantation.

Patient No.	IS after reKT	P-Cr ($\mu\text{mol/l}$) at FU	BK viraemia (copies/ml)	BK viruria (copies/ml)	FU from reKT (months)
1 (2nd reKT)	CsA, MMF	140	<1000	9070	39
2	Tac, Siro	128	<1000	<1000	20
3	Tac, Siro	211*	<1000	<1000	9
4	Tac, Siro	195	7603	130 000 000	55
Median (range)					30 (9–55)

IS, immunosuppression; reKT, kidney retransplantation; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetil; Siro, sirolimus; Tac, tacrolimus; FU, follow-up.

Graft function in patient 3 recovering after early acute tubular necrosis.

opinion, they do not seem to offer much support for pre-emptive retransplantation in the setting of active infection. Such an approach had failed in the case of patient 1 described previously [10], in whom PVAN recurred 6 months after a pre-emptive reKT. In the other pre-emptive retransplantation case (patient 4), low-level plasma and high-level urine BKV replication and an impaired graft function were present at follow-up (Table 2), although no PVAN was found in graft biopsies performed 6 and 30 months after retransplantation. Of note, all kidneys used in our series were harvested from deceased donors. Thus, although living donor transplantation may offer certain advantages, both types of transplants should be considered for the purpose of retransplantation.

In conclusion, reKT represents an effective treatment modality in SPK patients with kidney failure on account of PVAN. While evidence from randomized trials is lacking and kidney susceptibility to BK infection may vary, our experience seems to suggest, that it should be done preferably after attaining a significant reduction of BK viral loads through modification of immunosuppression and/or ureteronephrectomy of the primary graft [7]. Systematic monitoring with the use of reliable plasma and urine quantitative assays is indicated for this purpose. Active surveillance is also mandatory following retransplantation to ensure an early detection of recurrence and timely intervention.

Authorship

PB, FS, KL, MA and HHH: designed and performed research; MM, TJ, LV, EH and HHH: collected and analyzed data; MM and PB: wrote the paper; HHH: reviewed the paper.

Funding sources

Supported by the NR8894-3 grant, Internal Grant Agency, Czech Ministry of Health.

References

- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; **79**: 1277.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004; **4**: 2082.
- Ramos E, Vincenti F, Lu WX, et al. Retransplantation in patients with graft loss caused by polyoma virus nephropathy. *Transplantation* 2004; **77**: 131.
- Hirsch HH, Ramos E. Retransplantation after polyomavirus-associated nephropathy: just do it? *Am J Transplant* 2006; **6**: 7.
- Lipshutz GS, Mahanty H, Feng S, et al. BKV in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients: a leading cause of renal graft loss in first 2 years post-transplant. *Am J Transplant* 2004; **5**: 366.
- Gupta G, Shapiro R, Thai N, Randhawa PS, Vats A. Low incidence of BK virus nephropathy after simultaneous kidney pancreas transplantation. *Transplantation* 2006; **82**: 382.
- Al Jedai AH, Honaker MR, Trofe J, et al. Renal allograft loss as the result of polyomavirus interstitial nephritis after simultaneous kidney-pancreas transplantation: results with kidney retransplantation. *Transplantation* 2003; **75**: 490.
- Funk GA, Steiger J, Hirsch HH. Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; **193**: 80.
- Womer KL, Meier-Kriesche HU, Patton PR, et al. Preemptive retransplantation for BK virus nephropathy: successful outcome despite active viremia. *Am J Transplant* 2006; **6**: 209.
- Boucek P, Voska L, Saudek F. Successful retransplantation after renal allograft loss to polyoma virus interstitial nephritis. *Transplantation* 2002; **74**: 1478.

**LÉČBA DIABETU TRANSPLANTACÍ IZOLOVANÝCH
LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ**

Saudek F., Girman P., Kříž J., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., Vávrová E., **Mindlová M.**, Habart D., Peregrin J., Lipár K., Oliverius M., Dovolilová E., Číhalová E., Bobek V

Čas. Lék. čes., 2011, 150, pp. 49-55.

INSTITUT
KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
Informační a komunikační úsek
VĚDECKÁ LÉKARSKÁ KNHOVNA
140 21 Praha 4-Josef, Videná 1855

14-02-2011



VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKARSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

Z OBSAHU:

IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny – na prahu páté dekády úspěšné existence *Malý J.*

Katetrizační ablace fibrilace síní *Peichl P, a kol.*

Hyperglykémie a její kontrola u dospělých pacientů v intenzivní péči *Kotulák T, a kol.*

Přínos dlouhodobé pulzatilní mechanické srdeční podpory u multiorgánově selhávajících pacientů v terminálním srdečním selhání *Netuka I, a kol.*

Léčba diabetu transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků *Saudek F, a kol.*

Transplantace ledviny v IKEM *Viklický O, a kol.*

Výsledky dlouhodobého sledování prvních 500 pacientů po transplantaci jater provedených v IKEM v Praze *Trunečka P, a kol.*

Transplantace jater u pacientů s trombózou portální žíly *Janoušek L, a kol.*

Institut klinické a experimentální medicíny – 40 let.

MK ČR E 77
ISSN 0008 – 7335
150 – 2011

Časopis je indexován v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik Rady pro výzkum, vývoj a inovace Úřadu vlády ČR.

1/2011

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

INSTITUT
KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
Informační a komunikační úsek
VĚDECKÁ LÉKAŘSKÁ KNIHOVNA
140 21 Praha 4-Krč. Vídeňská 1958/9
- 5 -

14-02-2011

ČAS. LÉK. ČES., 150
2011, č. 1, s. 1-88
CLC EAL 150 (1)
1-88 (2011)

INDEXED IN:
EMBASE/Excerpta Medica
MEDLINE/Index Medicus
INIS Atomindex
CHEMICAL ABSTRACTS
Excerptováno v Bibliographia
Medica Czechoslovaca, Scopus

ROČNÍK 150/2011, č. 1

VEDOUcí REDAKTOR

Prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.
I. interní klinika 3. LF UK a FNKV
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

HOSTUJÍCÍ EDITOR

MUDr. Pavel Trunečka, CSc., přednosta
Transplantcentrum IKEM
Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

REDAKČNÍ RADA

Prof. MUDr. Pavel Barták, CSc.
Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV
Šrobárova 50, 100 00 Praha 10

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc.
CLS JEP
Sokolská 31, 120 26 Praha 2

Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Doc. MUDr. Petr Čáp, PhD.
Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie
Nemocnice Na Homolce
Rentgenova 2, 150 30 Praha 5

Prof. MUDr. Jan Dvořáček, DrSc.
Urologická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 6, 128 00 Praha 2

MUDr. Norbert Gaier, CSc.
Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN
Albertov 4, 128 00 Praha 2

Prof. MUDr. Miloš Hájek, DrSc.
Chirurgická klinika ÚVN
U Vojenské nemocnice 1/200, 169 02 Praha 6

Pavel Hamet, M.D., PhD.
Centre hospitalier de l'université de Montreal
Hotel Dieu, 3840, rue Saint-Urbain
Montreal (Québec) H2W 1T8, Canada

Prof. MUDr. Jan Holčík, DrSc.
Ústav sociálního lékařství a veřejného zdravotnictví LF
MU
Kamenice 5, 625 00 Brno – Bohunice

Prof. MUDr. Zbyněk Hrnčíř, DrSc.
II. interní klinika LF UK a FN
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Prof. MUDr. Ivan Hulín, DrSc.
Ústav patologické fyziologie LF UK
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

Doc. MUDr. Peter Jarčuška, PhD.
I. interní klinika FN
třída SNP 83/11, 040 11 Košice, Slovenská republika

MUDr. Pavel Jerie
Leymenstrasse 49
4153 Reinach, BL 1
Švýcarsko

Doc. MUDr. Lubomír Kukla, CSc.
Oddělení preventivní a sociální pediatrie LF MU
Bieblova 16, 613 00 Brno

Doc. MUDr. Jaroslav Lindner, CSc.
II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie
1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Doc. MUDr. Pavel Mohr, Ph.D.
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91/7, 181 02 Praha-Bohnice

Prof. MUDr. Jan Petrášek, DrSc. – čestný člen
redakční rady
III. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.
Onkologická klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Prof. PhDr. Milada Říhová, CSc.
Ústav dějin lékařství a cizích jazyků 1. LF UK
Karlovo náměstí 40, 120 00 Praha 2

Prof. Alexander Schirger, M.D.
Mayo Clinic, Hypertension W-9
Rochester, Minnesota 55905, USA

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
III. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Eduard Zvěřina, DrSc.
Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.
IV. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

KONZULTANTI

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.
1. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 2, 121 09 Praha 2

Prof. MUDr. Evžen Růžička, DrSc.
Neurologická klinika 1. LF UK a VFN
Kateřinská 30, 120 21 Praha 2

OBSAH

Úvodník		
<i>Malý J. IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny – na prahu páté dekády úspěšné existence</i>	3	
<i>Bartoš V. IKEM – odborné, politické a další souvislosti vzniku a dosavadního vývoje</i>	5	
Přehledové články		
<i>Jirsa M. Molekulární diagnostika dědičných forem intrahepatální cholestázy a familiálních hyperbilirubinemií</i>	7	
<i>Pečih P, Čihák R, Wichterle D, Kautzner J. Katerizační ablace fibrilace síní</i>	14	
<i>Kotulák T, Říha H, Haluzík M. Hyperglykémie a její kontrola u dospělých pacientů v intenzivní péči</i>	20	
<i>Kieslichová E, Ročen M, Fraňková S, Trunečka P. Akutní selhání jater: současná doporučení</i>	24	
<i>Hyánková O, Ročen M, Kieslichová E, Mixa V, Prochlik M, Kotalová R, Špičák J, Adamec M, Trunečka P. Specifika perioperační péče o pediatrické pacienty podstupující transplantaci jater</i>	31	
<i>Pokorná E. Zemřelí dárce orgánů k transplantacím</i>	34	
Původní práce		
<i>Honsová E, Lodererová A, Fraňková S, Oliverius M, Trunečka P. Glypican-3 immunostaining significantly improves histological diagnosis of hepatocellular carcinoma</i>	37	
<i>Janoušek L, Marada T, Chlupáč J, Lipár K, Baláz P, Rokošný S, Matia I, Adamec M. Everzní endarterektomie arterie carotis interna: hodnocení výsledků po změně operační techniky</i>	41	
<i>Netuka I, Malý J, Říha H, Szarszoi O, Dorazilová Z, Skalský I, Turek D, Urban M, Kettner J, Pírk J. Přenos dlouhodobé pulzní mechanické srdeční podpory u multiorgánové selhávající pacientů v terminálním srdečním selhání</i>	44	
<i>Saudek F, Gírmán P, Kříž J, Berková Z, Zacharovová K, Koblas T, Pektorová L, Vávřová E, Habart D, Peregrin J, Lipár K, Oliverius M, Dovolilová E, Čihálová E, Bobek V. Léčba diabetu transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků</i>	49	
<i>Viklický O, Slatinská J, Bürgelová M, Vitko S, Urbanová M, Lažanská R, Hanzal V, Bartůš V, Teplan V, Matl I, Janoušek L, Honsová E, Drastichová M, Malý J. Transplantace ledviny v IKEM</i>	56	
<i>Trunečka P, Adamec M, Špičák J, Honsová E, Kieslichová E, Lánská V, Peregrin J, Kučera M, Janoušek L, Oliverius M, Drastich P, Ročen M, Danč R, Gottfriedová H, Šperl J, Pokorná E, Vitko S, Malý J. Výsledky dlouhodobého sledování prvních 500 pacientů po transplantaci jater provedených v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze</i>	60	
<i>Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, Voska L, Hejlová I, Trunečka P. Stanovení obsahu jaterního tuku metodou 1H MR spektroskopie</i>	68	
<i>Janoušek L, Adamec M, Oliverius M, Trunečka P, Kučera M. Transplantace jater u pacientů s trombozou portální žíly</i>	72	
<i>Rokošný S, Baláz P, Wohlfahrt P, Janoušek L, Adamec M. Vliv chirurgických komplikací na funkci transplantované ledviny</i>	75	
Sjezdy		
<i>Brdička R. Molecular Diagnostic Europe (Hannover, 4. až 7. října 2010)</i>	79	
<i>Králiková E. Conference Tabák a zdraví po jedenácté v Lékařském domě (Praha, 5. listopadu 2010)</i>	81	
Osobní zprávy	82	
Zprávy	83	
Knihy	484	
Pokyny pro autory Časopisu lékařů českých	85	
Laureáti Nobelovy ceny		
<i>Cech P. Charles Brenton Huggins</i>	87	

CONTENTS

(No. 1, 20th Januar 2011) Journal of Czech Physicians

Editorial		
<i>Malý J. IKEM – Institute of Clinical and Experimental Medicine – at the door of the fifth decade of its successful existence</i>	3	
<i>Bartoš V. IKEM – professional, political and other circumstances of its founding and present development</i>	5	
Review Article		
<i>Jirsa M. Molecular diagnosis of hereditary canalicular cholestasis and familial hyperbilirubinemia</i>	7	
<i>Pečih P, Čihák R, Wichterle D, Kautzner J. Catheter ablation in atrial fibrillation</i>	14	
<i>Kotulák T, Říha H, Haluzík M. Hyperglycemia and its control in the critically ill patient</i>	20	
<i>Kieslichová E, Ročen M, Fraňková S, Trunečka P. Acute liver failure: Present recommendations</i>	24	
<i>Hyánková O, Ročen M, Kieslichová E, Mixa V, Prochlik M, Kotalová R, Špičák J, Adamec M, Trunečka P. Specific program for perioperative care in paediatric liver transplantation</i>	31	
<i>Pokorná E. Cadaver organ donor in transplantation</i>	34	
Original Article		
<i>Honsová E, Lodererová A, Fraňková S, Oliverius M, Trunečka P. Glypican-3 immunostaining significantly improves histological diagnosis of hepatocellular carcinoma</i>	37	
<i>Janoušek L, Marada T, Chlupáč J, Lipár K, Baláz P, Rokošný S, Matia I, Adamec M. Everson carotid endarterectomy: evaluation of results after changing the operation technique</i>	41	
<i>Netuka I, Malý J, Říha H, Szarszoi O, Dorazilová Z, Skalský I, Turek D, Urban M, Kettner J, Pírk J. Benefit of paracorporeal pulsatile assist device in multiorgan failing patients in terminal stage of heart failure</i>	44	
<i>Saudek F, Gírmán P, Kříž J, Berková Z, Zacharovová K, Koblas T, Pektorová L, Vávřová E, Habart D, Peregrin J, Lipár K, Oliverius M, Dovolilová E, Čihálová E, Bobek V. Islet transplantation for treatment of type-1 diabetes mellitus</i>	49	
<i>Viklický O, Slatinská J, Bürgelová M, Vitko S, Urbanová M, Lažanská R, Hanzal V, Bartůš V, Teplan V, Matl I, Janoušek L, Honsová E, Drastichová M, Malý J. Kidney transplantation at the Institute of Clinical and Experimental Medicine</i>	56	
<i>Trunečka P, Adamec M, Špičák J, Honsová E, Kieslichová E, Lánská V, Peregrin J, Kučera M, Janoušek L, Oliverius M, Drastich P, Ročen M, Danč R, Gottfriedová H, Šperl J, Pokorná E, Vitko S, Malý J. Long-term follow-up of the first 500 liver transplant recipients transplanted at the Institute of Clinical and Experimental Medicine in Prague</i>	60	
<i>Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, Voska L, Hejlová I, Trunečka P. Determination of liver triglycerides by 1H MR spectroscopy</i>	68	
<i>Janoušek L, Adamec M, Oliverius M, Trunečka P, Kučera M. Liver transplantation in patients with portal vein thrombosis</i>	72	
<i>Rokošný S, Baláz P, Wohlfahrt P, Janoušek L, Adamec M. The influence of surgical complications on renal graft function</i>	75	
Congresses		
<i>Brdička R. Molecular Diagnostic Europe (Hannover, October 4-7, 2010)</i>	79	
<i>Králiková E. Conference Tobacco and Health eleventh time in the Medical House (Prague, November 2, 2010)</i>	81	
Personal News	82	
News	83	
Books	84	
Instructions to the of Authors	86	
Nobel Prize Laureates		
<i>Cech P. Charles Brenton Huggins</i>	87	

<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2011

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

Vydává: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Vedoucí redaktor: prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Helena Glezgová, e-mail: helenaglezgova@seznam.cz

Príspevky do Časopisu lékařů českých procházejí zdvojeným recenzním řízením.

Articles Publisher in the Journal of the Czech Physicians subject to double review.

Tiskne: Tiskárna Prager – LD s.r.o., Kováků 9, 150 00 Praha 5. Rozšiřuje v ČR: Nakladatelství Olympia, a.s., Praha, do zahraničí (kromě SR): Myris Trade s.r.o., V Stihlách 1311/3, P.O.Box 2, 142 01 Praha 4, myris@myris.cz, 234 035 205, v SR Mediaprint-Kapa Pressgrosso, a.s., oddelenie inej formy predaja, P.O.Box 183, Vajnorská 137, 830 00 Bratislava 3, tel.: 004212444 588 16, 00421 244 458 821, fax: 00421 244 458 819, e-mail: predplatne@abompkapa.sk

Vychází: 12x ročně. Předplatné: na rok pro ČR je 1224 Kč, SR 59,40 €, jednotlivé číslo 102 Kč, SR 4,95 €.

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá:

Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – J. Spalová, e-mail: spalova@cls.cz

Informace o podmínkách inzercí poskytuje a objednávky přijímá: Inzertní oddělení ČLS JEP,

tel.: 224 266 253, tel./fax: 224 266 265, e-mail: ntsinzerce@cls.cz

Registrační značka MK ČR E77.

Rukopisy zasílejte na adresu: Prof. MUDr. Jiří Horák, CSc., I. interní klinika 3. LF UK a FNKV, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, e-mail: horak@fnkv.cz

Rukopis byl předán do výroby 16. 1. 2011. Zasláné příspěvky se nevracejí.

Vydavatel získává otiskem příspěvku výlučně nakladatelské právo k jeho užití.

Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu.

Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována za účelem dalšího rozšiřování v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopí, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

Léčba diabetu transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků

František Saudek, Peter Girman, Jan Kříž, Zuzana Berková, Klára Zacharovová, Tomáš Koblas, Lenka Pektorová, Ema Vávrová, Martina Mindlová, David Habart, Jan Peregrin, Květoslav Lipár, Martin Oliverius, Eva Dovolilová, Evžena Číhalová, Vít Bobek

Institut klinické a experimentální medicíny Praha, Klinika diabetologie, Centrum diabetologie

SOUHRN

Východisko. Orgánová transplantace pankreatu představuje zatím jedinou metodou umožňující dlouhodobou normalizaci glukózového metabolismu u diabetiků 1. typu. Je však často provázána chirurgickými komplikacemi. Jako bezpečnější alternativa byla v IKEM v roce 2005 v rámci klinického experimentu zavedena metoda transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků.

Metody a výsledky. Ostrůvky jsme izolovali z pankreatů dárců s mozkovou smrtí, které nesplňovaly kritéria pro provedení orgánové transplantace. Do srpna 2010 bylo provedeno celkem 36 implantací ostrůvků u 28 C-peptid negativních pacientů s diabetem 1. typu. U 15 osob (21 implantací) byl hlavní indikací mimořádně labilní průběh diabetu, provázený syndromem porušeného vnímání hypoglykémie při intenzifikované inzulínové terapii. V osmi případech byla provedena kombinovaná transplantace, a to 5× současně s ledvinou a 3× současně s játry. U pěti pacientů podstupujících pankreatektomii jsme provedli autologní transplantaci ostrůvků. S výjimkou jedné primární afunkce vedla transplantace ostrůvků ke kompletní úpravě syndromu porušeného vnímání hypoglykémie. Jedenáct pacientů z 15 v této skupině mělo po jednom roce signifikantní produkci C-peptidu ($> 0,2$ pmol/ml). Žádný pacient v průběhu jednoletého sledování nezemřel. Průměrná dávka inzulínu po allotransplantaci klesla z 37 na 14 j. inzulínu denně a celkem tři osoby mohly přerušit podávání inzulínu. U šesti osob se vyskytly závažné technické komplikace, jež pouze 2× vyžadovaly chirurgickou revizi a neměly dlouhodobé následky.

Závěry. Transplantace Langerhansových ostrůvků představuje oproti orgánové transplantaci pankreatu podstatně bezpečnější metodu obnovy endogenní sekrece inzulínu. U labilního diabetu eliminuje závažné hypoglykémie, ale k ukončení inzulínové léčby vede zatím zřídka. Díky pokrokům v laboratorní přípravě i v samotné transplantaci se však výsledky postupně zlepšují.

Klíčová slova: diabetes mellitus 1. typu, transplantace, Langerhansovy ostrůvky, slinivka břišní, inzulín, imunosuprese, komplikace diabetu.

SUMMARY

Saudek F, Girman P, Kříž J, Berková Z, Zacharovová K, Koblas T, Pektorová L, Vávrová E, Mindlová M, Habart D, Peregrin J, Lipár K, Oliverius M, Dovolilová E, Číhalová E, Bobek V. Islet transplantation for treatment of type-1 diabetes mellitus

Background. Organ pancreas transplantation represents the only method enabling long-term normalization of glucose metabolism in type-1 diabetic subjects so far. Unfortunately, surgical complications of this kind of therapy are still frequent. As a safer alternative, transplantation of isolated pancreatic islets was introduced at the Institute for Clinical and Experimental Medicine as a clinical experiment in the year 2005.

Methods and results. We isolated the islets from pancreases of cadaveric donors which did not fulfil criteria to perform organ pancreas transplantation. Altogether, 36 islet implantations were performed in 28 C-peptide negative subjects suffering from type-1 diabetes by August 2010. In 15 subjects (21 implantations) the main indication was extremely instable course of diabetes due to the hypoglycaemia unawareness syndrome. In 5 and 3 cases, combined islet and kidney and islet and liver transplants were performed, respectively. In addition, islet autotransplantation was performed in 5 subjects undergoing total pancreatectomy. No patient died during the study period. In all but 1 patient with primary islet afuction, islet transplantation led to a complete cure of the hypoglycemia unawareness syndrome. Out of 15 patients, 11 subjects in this group showed a significant C-peptide production (> 0.2 pmol/ml) after 1 year. The mean insulin dose after allotransplantation decreased from 37 to 14 units per day and in 3 subjects, insulin therapy could be withdrawn. Serious technical complications occurred in 6 subjects, which only in 2 cases required surgical revision and did not cause long-term sequelae.

Conclusions. In comparison with organ pancreas transplantation, pancreatic islet transplantation represents a substantially safer method for restitution of endogenous insulin production. Though it eliminates serious hypoglycemic episodes in labile diabetes, complete insulin withdrawal is still often not possible. However, due to continuing progress in the laboratory techniques as well as in the transplant procedure itself, the results are steadily improving.

Key words: type 1 diabetes mellitus, transplantation, islets of Langerhans, pancreas, insulin, immunosuppressive therapy, diabetic complications

Sa.

Čas Lék čes 2011; 150: 49–55

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

prof. MUDr. František Saudek, DrSc.
Klinika diabetologie, Centrum diabetologie IKEM
Václavská 1958/9, 140 21 Praha 4
fax: +420 261 362 280, e-mail: frsa@medicon.cz

ÚVOD

Zavedení inzulínové léčby v roce 1922 znamenalo zásadní přelom pro osud pacientů, kteří onemocněli diabetes mellitus 1. typu (1). Ani dnes se však nepodařilo pomocí intenzifikované inzulínové léčby zabránit vzniku pozdních komplikací diabetu, jejichž příčinou je dlouhodobá hyperglykémie. Hlav-

ní limit pro dosažení normálních hodnot krevního cukru při inzulinové léčbě představuje riziko hypoglykemií (2). Dosáhnout trvale normálních hodnot glykémie se podařilo teprve pomocí orgánové transplantace pankreatu, jež se postupně stala v kombinaci se současnou transplantací ledviny metodou volby pro léčbu pacientů s diabetem 1. typu a chronickou nedostatečností ledvin.

V České republice se transplantace pankreatu provádějí od roku 1983 (3) a do současné doby bylo tímto způsobem léčeno více než 380 osob. Kromě pacientů, kteří současně podstupují transplantaci ledviny, nebo kteří ji podstoupili již dříve, může být transplantace pankreatu indikována také u nemocných s mimořádně nestabilním průběhem, kteří trpí tzv. syndromem porušeného vnímání hypoglykémie, případně u kterých překotně progredující mikroangiopatické komplikace navzdory dostupným konzervativním opatřením (4).

Kromě nutnosti trvale užívat imunosupresivní léčbu spočívá hlavní nevýhoda orgánové transplantace pankreatu v její technické obtížnosti a nezanedbatelném riziku chirurgických komplikací (5, 6). Proto se postupně vyvíjela metoda transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků, při které se ostrůvky nejprve oddělí od exokrinní tkáně a pak jsou teprve implantovány cestou vrátnicové žíly do jater (7, 8). Zatímco samotná implantace je oproti orgánové transplantaci pro pacienta poměrně jednoduchá, hlavní technický problém představuje získání dostatečného množství vitálních ostrůvků, které jsou schopné se v jaterním řečišti připojit a obnovit v nepřírodném prostředí chybějící sekreci inzulinu.

První série klinicky úspěšných výkonů byla hlášena teprve v roce 2000 v kanadském Edmontonu (9), kdy u sedmi po sobě následujících pacientů, kteří podstoupili 2–3 transplantace ostrůvků, bylo možné přerušit inzulinovou léčbu. Úspěch, který spočíval ve volbě optimálních orgánů pro transplantaci, vylepšené izolační technice a použití imunosupresivní léčby bez kortikosteroidů, se v prospektivní mezinárodní studii podařilo reprodukovat jen obtížně (10) a jen u části zařazených pacientů bylo možné inzulinovou léčbu přerušit. Podle obdobného protokolu bylo od roku 2000 provedeno v různých centrech asi 1000 ostrůvkových transplantací s různým úspěchem. Ukázalo se, že i když se ve většině případů nepodařilo dosáhnout robustní normalizace glykemií, u většiny pacientů s obnovenou endogenní produkcí inzulinu se výrazně zlepšila řada krátkodobých i dlouhodobých ukazatelů. Hlavním přínosem byla praktická eliminace těžkých hypoglykemických epizod a zlepšení kompenzace diabetu. Další sledování však také ukázalo celkové zlepšení kvality života, úpravu kardiovaskulárních rizikových faktorů a oproti srovnatelné skupině pacientů léčených konzervativně stabilizací nebo dokonce i zlepšení diabetické retinopatie (11).

V Institutu klinické a experimentální medicíny byla po systematické experimentální přípravě metoda transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků zavedena do klinické praxe v roce 2005, a to jako alternativa pro klinicky již osvědčenou orgánovou transplantaci pankreatu. Léčba byla na prvním místě nabídnuta pacientům s dlouhodobě nestabilním diabetem 1. typu, jenž byl provázen těžkými hypoglykemickými stavy s poruchou vědomí a nezbytností zásahu další osoby. Další kategorií příjemců pak představovali nemocní s diabetem 1. typu, kteří současně podstupovali transplantaci jater nebo ledviny a u nichž tedy byla v každém případě zahajována imunosupresivní léčba. Zvládnutí techniky izolace ostrůvků pak dovolilo provést autotransplantaci ostrůvků u pacientů, kteří podstupovali totální či reziduální pankreatektomii pro nemaligní onemocnění pankreatu.

POUŽITÉ METODY

Program izolace a transplantace lidských Langerhansových ostrůvků od kadaverálních dárců s mozkovou smrtí byl zahájen v roce 2005 po předchozím souhlasu Etické komi-

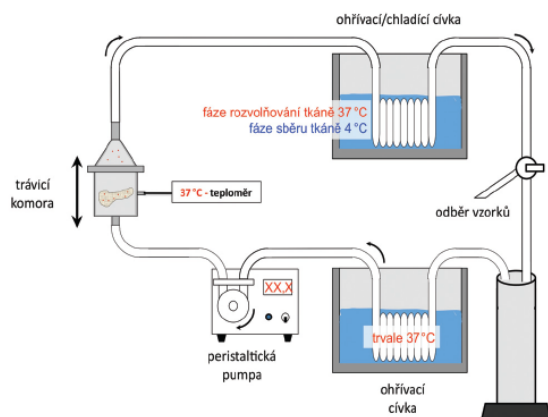
se Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerovy nemocnice. Hlavními kritérii pro odběr slinivky břišní za účelem izolace ostrůvků byla nepřítomnost diabetu v anamnéze, věk od 18 do 65 let a makroskopicky neporušená struktura orgánu. Orgány dárců s věkem do 45 let a body mass indexem pod 30 kg/m² byly přednostně alokovány pro orgánovou transplantaci pankreatu. Ke konzervaci byl ve většině případů použit roztok HTK. Cílem bylo udržet maximální dobu studené ischemie (od perфуze konzervačním roztokem do zahájení izolace) pod 10 hodin.

Odebraná slivinka byla spolu se slezinou a přilehlým segmentem duodena uložena v roztoku HTK při teplotě tajícího ledu a transportována izolačním týmu, který tvořily 3 až 4 osoby. Izolace probíhala za sterilních podmínek v místnosti opatřené filtrací vzduchu a vybavené laminárními boxy splňujícími stupeň čistoty A. Po několikastupňové dekontaminaci roztokem obsahujícím antibiotika, antitumorka a iodosol byl nejprve podvázán pankreatický vývod a byly odpreparovány duodenum a slezina. Po odstranění většiny tuků při zachování integrity pankreatické kapsuly jsme přes incizi v oblasti hlavy a těla pankreatu kanylovali oboustranně pankreatický vývod a injikovali enzym kolagenázu (Liberase Roche nebo Collagenase Serva) v 250 ml roztoku pomocí peristaltických pump při udržování tlaku 80 mm Hg a teplotě roztoku 4 °C. Při použití přípravku Collagenase jsme současně použili neutrální proteázu (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) v množství 100 ml. Po dokonalé distenzi žlázy jsme na chlazené podložce odpreparovali cévní struktury, kapsulu a zbyývající tuk. Poté byla slivinka rozdělena do 10–14 částí a umístěna v izolační komoře, napojené na recirkulační systém s řízenou teplotou. Izolační komora byla vybavena sítí o velikosti otvorů 0,4 mm a skleněnými kulíčkami pro lepší míchání. V systému cirkuloval roztok Hank's balanced salt solution, do kterého jsme přidali zbyývající roztok kolagenázy, který se uvolnil v průběhu distenze. Systém byl za kontinuálního řízení kmitání postupně ohříván na 37 °C. Schéma izolačních zařízení, které bylo vyrobeno v několika prototypech, ukazuje obrázek 1.

Účinkem kolagenázy se postupně uvolňují fragmenty tkáně pankreatu, které procházejí sítí v izolační komoře. Jakmile se objeví ve vzorcích roztoku izolované ostrůvky v dostatečném množství, je ukončena recirkulace, zahájeno chlazení a ředěný roztok s tkání pankreatu je sbírán a centrifugován. Po ukončení digesce zůstávají v izolační komoře pouze zbytky vaziva a cév, zatímco v nasbíraném roztoku by ostrůvky neměly být účinkem kolagenázy destrukovány.

Průběh digesce byl kontrolován pomocí stereomikroskopu. Vzorky tkáně uvolňující se z pankreatu byly označeny inzulin specifickým barvivem (dithizon), které umožňuje jednoznačně odlišit ostrůvky od exokrinní tkáně. V okamžiku, kdy byla většina ostrůvků uvolněna, jsme zahájili sběr rozvolněné tkáně a současně jsme inaktivovali kolagenázu postupným chlazením a ředěním pomocí vymývacího roztoku. Tkáň jsme sbírali do vychlazeného roztoku lidského albuminu.

Po několikanásobném promytí činil objem nepurifikované tkáně 30–60 ml. Následně byla peleta tkáně postupně infundována do buněčného separátoru COBE 2991, ve kterém byl připraven kontinuální denzitní gradient pomocí roztoku fikolu (Biocoll, Biochrom, Německo) s rozpětím specifické hmotnosti od 1066 do 1090 g/l. V případě úspěšné izolace sedimentovala v průběhu centrifugace převážná část exokrinní tkáně do periferie rotujícího vaku, zatímco většinu ostrůvků jsme identifikovali v oddělené vrstvě, kterou jsme separátně odebrali. Ostrůvky byly dále promyty a kvantifikovány (12). V případě autotransplantace nebyla purifikace ostrůvků pomocí buněčného separátoru prováděna. Sterilita byla testována mikrobiologickým vyšetřením odebraného orgánu, tkáně získané na konci izolace a finálního přípravku před transplantací. Vitalita tkáně byla testována intravitálním barvením akridinovou oranží a propidium



Obr. 1. Schéma izolačního zařízení

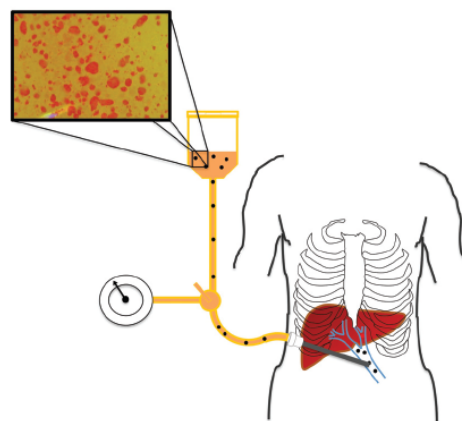
jodidem. Vzorky ostrůvků byly odebírány pro ex post testování sekrece inzulinu *in vitro* při různých koncentracích glukózy.

Před transplantací byly ostrůvky po dobu 4–48 hodin uchovávány v suplementovaném CMRL médiu (13). V některých případech byly ostrůvky značené v kultuře pomocí nanočástic železa za účelem následného zobrazení po transplantaci pomocí magnetické rezonance (14). K transplantačním účelům byly ostrůvky použity v případě, jestliže jejich celkový počet, přepočítaný na tzv. ostrůvkové ekvivalenty (ostrůvky o průměru 0,15 mm) činil v případě allotransplantace alespoň 250 000. Při autotransplantaci jsme byli připraveni transplantovat intaktní ostrůvky bez ohledu na jejich celkový počet. Výsledky mikrobiologických vyšetření byly zpravidla k dispozici teprve *ex post* po provedené transplantaci. Byly nicméně ve všech případech negativní a opravňovaly tedy pokračovat v zavedeném postupu.

Transplantační výkon byl ve všech případech **samostatné transplantace ostrůvků** proveden metodou gravitační infuze do vena portae. Kanylace vena portae proběhla transkutánně pod radiologickou kontrolou v místním znecitlivění. V průběhu implantace byl přímou metodou měřen portální tlak. Typicky byly ostrůvky podány ve dvou vracích s 250 ml roztoku, z nichž každý obsahoval 35 j. heparinu na 1 kg hmotnosti příjemce. Při vytahování implantační kanyly byl kanylační trakt plněn hemostatickou zátkou (15). Schéma implantace ostrůvků ukazuje obrázek 2.

Při současné transplantaci izolovaných ostrůvků spolu s játry (tři případy) či spolu s ledvinou od stejného dárce byla implantace ostrůvků provedena přímou kanylací mesenterické žíly po ukončení transplantace orgánu (jater či ledviny) a místo punkce bylo po vytažení kanyly ošetřeno stehem.

Imunosupresivní léčba po allotransplantaci samotných ostrůvků či ostrůvků a ledviny odpovídala původnímu Edmontonskému protokolu a spočívala v indukčním podání daclizumabu či anti-T-lymfocytárního globulinu (ATG Fresenius) před transplantací spolu s jednou dávkou methylprednisolonu (500 mg). Indukční léčba byla podána co nejdříve od okamžiku, kdy byla indikace v konkrétním případě potvrzena podle aktuálního vyšetření příjemce, ověření množství a kvality izolovaných ostrůvků a negativit vyšetření cross-match. Důvodem bylo předejít maximálnímu diabetogennímu působení methylprednisolonu a případné cytokinové reakci po podání ATG v době aplikace ostrůvků. Dávku daclizumabu či ATG jsme ještě 1× opakovali. Udržovací léčba spočívala v podávání rapamycinu (cílové koncentrace 5–10, po 3 měsících 3–6 ng/ml) a tacrolimu (cílové koncentrace 2–8 ng/ml, od 3 měsících 2–5 ng/ml). Steroidy nebyly podávány.



Obr. 2. Schéma transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků

VÝSLEDKY

Od roku 2005 bylo na našem pracovišti provedeno celkem 36 implantací u 28 pacientů. Z hlediska indikace a techniky transplantace se jedná o heterogenní skupinu příjemců, kterou je vhodné hodnotit v jednotlivých kategoriích (tab. 1).

Průměrný počet ostrůvků (\pm SD)

První kategorii představují příjemci izolovaných **alogenních ostrůvků**. Hlavním indikačním kritériem byl dlouhodobě nestabilní diabetes mellitus 1. typu provázený syndromem porušeného vnímání hypoglykémie (16) s alespoň čtyřmi těžkými hypoglykemickými epizodami v posledním roce (vyžadující pomoc zdravotníka nebo jiné osoby), a to navzdory prokazatelně kvalifikované edukaci pacienta a použití dostupných technických prostředků, jako jsou inzulinové pumpy a frekventní monitorace glykemií. Předtransplantační vyšetření vyloučilo závažné rizikové faktory transplantace, zejména kardiovaskulární postižení, aktivní syndrom diabetické nohy a infekční onemocnění. Všichni pacienti byli podrobně seznámeni s průběhem a možným rizikem léčby a vyjádřili písemně svůj souhlas s jejím provedením. Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 2.

U čtyř pacientů byly ostrůvky transplantovány celkem 3×, u šesti pacientů 2× a u ostatních pouze 1×. U jednoho příjemce nedošlo vůbec k obnově sekrece inzulinu a imunosupresivní léčba byla záhy ukončena. V jedenácti případech trvala významná produkce C-peptidu minimálně jeden rok. Průměrné koncentrace C-peptidu, průměrné denní dávky inzulinu a průměrné hodnoty glykovaného hemoglobinu ukazují obrázky 3, 4 a 5.

Hospitalizace k provedení transplantace trvala zpravidla 7 dní. Po provedení výkonu v místním znecitlivění mohli pacienti přijímat potravu a zůstávali 12 hodin na lůžku. Po dobu 1 týdne byl podáván nízkomolekulární heparin. Inzulin byl podáván tak, aby pokud možno byly udrženy hodnoty glykémie v normálním rozmezí. Samotná implantace probíhala u většiny pacientů bez komplikací, pouze s přechodným vzestupem aktivity jaterních transamináz (troj- až čtyřnásobek normální hodnoty se spontánní úpravou). U čtyř příjemců se implantace komplikovala krvácením do jater nebo okolí. Později jsme se riziko krvácení snažili omezit použitím hemostatické zátky při odstraňování portálního katétru. Ve dvou případech si situace vyžádala chirurgický zákrok. U jedné pacientky došlo po aplikaci ostrůvků k symptomatické bradykardii, která byla pravděpodobně způsobena podrážděním peritonea při punkci portální žíly. V jednom případě byla transplantace komplikována punkcí žlučových cest a následním cholestatickým ikterem, který však spontánně ustoupil bez následků. Přehled závažných nežádoucích účinků ukazuje tabulka 3.

Tab. 1. Kategorie příjemců a přehled výsledků léčby

Kategorie	Počet implantací	Průměrný počet ostrůvků (\pm SD)*	1-roční přežívání pacientů (%)	C-peptid $\geq 0,2$ nmol/l 1 rok po transplantaci	Počet pacientů, u nichž byla přerušena léčba inzulinem
izolovaná transplantace ostrůvků	21 u 15 pacientů	744 278 \pm 314 262	100	11/15 73%	1
kombinovaná transplantace ostrůvků a ledviny	5	335 122 \pm 10 189	100	3/5 60%	1
kombinovaná transplantace ostrůvků a jater	3	195 667 \pm 44917	100	2/3 66%	1
autotransplantace ostrůvků.	5	148 600 \pm 105 659	100	3/5 60%	0

* Počet tzv. ostrůvkových ekvivalentů, jež odpovídají objemu ostrůvků o průměru 0,15 mm.

Tab. 2. Základní charakteristiky příjemců samotných Langerhansových ostrůvků (průměr \pm SD)

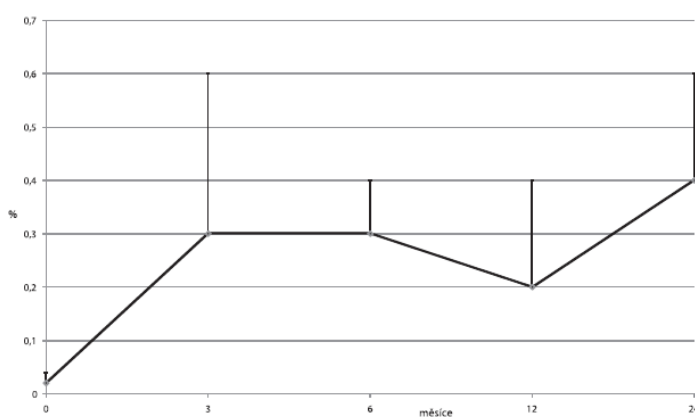
Počet příjemců	15
Počet transplantací	21
Věk (medián)	39 (30–58)
BMI (kg/m ²)	22 \pm 2,6
Trvání diabetu (medián)	25 (5–30)
Ženy/muži	9/6
Průměrná denní dávka inzulinu	37 \pm 10

U čtyř příjemců selhala funkce transplantovaných ostrůvků do 12 měsíců od implantace a potřeba inzulinu se vrátila k původním dávkám. Koncentrace C-peptidu v krvi byla detekovatelná a imunosupresivní léčba byla ukončena. Jedna pacientka byla na více než 3 roky zcela zbavena aplikace exogenního inzulinu. Její případ popisujeme podrobněji.

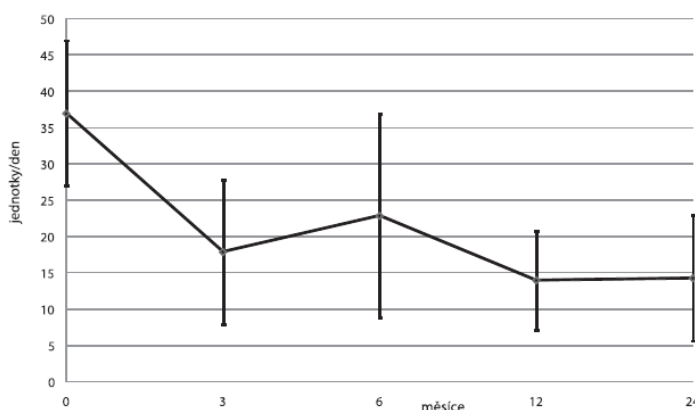
Kazuistika 1

Jednatřicetiletá žena s trváním diabetu od 3 let věku podstoupila transplantaci ostrůvků kvůli rychle progredujícím, zejména očním mikroangiopatickým komplikacím a syndromu porušeného vnímání hypoglykémie. Závažnější hypoglykémie se v poslední době vyskytovaly téměř každý týden. Proliferativní retinopatie byla na obou očích ošetřena laserovou fotokoagulací a vitrektomií zakaleného sklivce se zatím odkládala pro nestabilitu diabetu. Pacientku dále obtěžovala těžká forma senzorimotorické a autonomní diabetické polyneuropatie. Denní dávka inzulinu se při léčbě inzulinovou pumpou pohybovala okolo 30 j. denně, bazální i stimulovaná hladina C-peptidu byly pod detekčním limitem a hodnota glykovaného hemoglobinu byla 6,4 %. Hmotnost pacientky byla 50 kg.

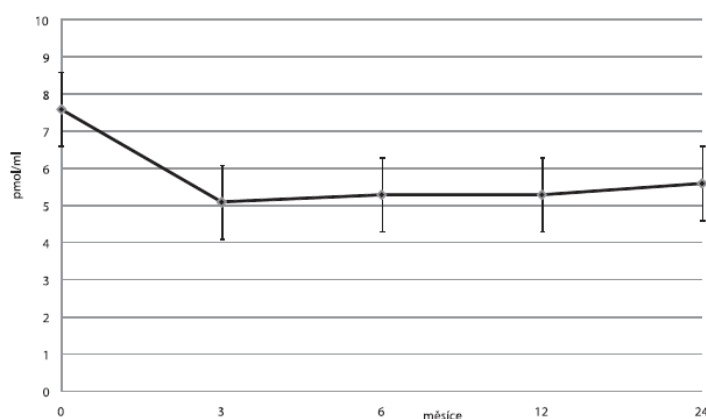
První implantace ostrůvků (celkový počet 367 930) proběhla nekomplikovaně v září 2006. Třetí den po transplantaci se funkce ostrůvků projevila snížením potřeby inzulinu a stabilizací glykemického profilu. Po týdnu byla pacientka opět zařazena do čekací listiny a další transplantace proběhla za 3 měsíce, kdy průměrná denní dávka inzulinu činila 19 j. Tentokrát bylo podáno 627 000 ostrůvků (ekvivalentů), které se podařilo získat od dvou dárců. Dvě hodiny po implantaci si pacientka začala stěžovat na bolesti břicha v oblasti vpichu. Sonografické vyšetření svědčilo pro krvácení a hematoma v podjaterní oblasti, které při následné revizi již nepokračovalo, ale bylo nutné odstranit rozsáhlý hematoma a podat dvě krevní transfuze. Další průběh byl již bez komplikací a pacientka byla propuštěna 10 dní po transplantaci prakticky normoglykemická a jenom s minimální potřebou inzulinu, který byl postupně na dobu 3 let vysazen. Stabilní stav dovolil provést oboustrannou vitrektomii, takže visus nyní dovoluje čtení s pomocí televizní lupy. Pacientka pracovala na částečný úvazek a nyní je na mateřské dovolené s dítětem, které adoptovala. Zahájila studium na vysoké škole. Její diabetes je velmi dobře kompenzován při potřebě 12 j. inzulinu denně, hypoglykémie se prakticky nevyskytují a glykovaný hemoglobin se pohybuje okolo 4,5 %. Pacientka je léčena tacrolimem a rapamycinem, které dobře toleruje. Během sledování se nezhoršila renální funkce a neobjevila se mikroalbuminurie.



Obr. 3. Průměrné hladiny C-peptidu (\pm SD) na lačno u příjemců v kategorii 1



Obr. 4. Průměrné denní dávky inzulinu (\pm SD) na lačno u příjemců v kategorii 1



Obr. 5. Průměrné hodnoty (± SD) glykovaného hemoglobinu (HbA1c) v kategorii I

Tab. 3. Výskyt závažných nežádoucích účinků po transplantaci samotných ostrůvků

Komplikace	Počet případů
trombóza	0
krvácení z toho s nutností revize	4 2
cholestatický ikterus	1
rejekce	?
infekce v ráně	0
vazovagální synkopa	1

Druhou kategorii příjemců představuje pět pacientů s diabetem 1. typu a diabetickou nefropatií ve stadiu **chronického selhání ledvin**, u kterých byla provedena současná transplantace ostrůvků a ledviny od stejného dárce. Štěp ledviny byl standardní metodou napojen na pánevní cévy, zatímco ostrůvky byly ze stejného kožního řezu infundovány intraperitoneálním přístupem přes větvi vena mesenterica inferior do portálního řečiště. Všechny pět kombinovaných transplantací proběhlo bez chirurgické komplikace. U tří pacientů po jednom roce trvala pozitivita C-peptidu ($> 0,2$ nmol/l) po jednom roce a jeden z nich zcela ukončil inzulínovou léčbu. U jedné pacientky se funkce štěpu ledviny ani ostrůvků nerozvinuly pro intenzivní humorní rejekci a u dalšího příjemce funkce ostrůvků zanikla v průběhu léčby akutní rejekce štěpu ledviny. Podrobněji popisujeme případ pacienta, který 10 měsíců po transplantaci zůstává bez potřeby inzulínu.

Kazuistika 2

U 61letého pacienta s pokročilými komplikacemi diabetu, po prodělaném infarktu myokardu, jenž byl léčen pravidelnou hemodialýzou, považoval kardiolog léčbu kombinovanou transplantací ledviny a pankreatu za příliš riskantní. Proto byl pacient v dubnu 2009 zařazen do čekací listiny pro transplantaci ledviny a ostrůvků. Výsledky inzulínové léčby byly dlouhodobě neuspokojivé (glykovaný hemoglobin 10,1 %), průměrná denní potřeba inzulínu byla 63 j. a hladina C-peptidu byl pod detekčním limitem. V prosinci 2009 tento pacient podstoupil bez větších komplikací kombinovanou transplantaci ledviny a ostrůvků (325 000 ekvivalentů). Bezprostředně po transplantaci se rozvinula funkce štěpu ledviny, byla ukončena léčba hemodialýzou a postupně se snižovala dávka inzulínu. V říjnu 2010 je pacient již 8 měsíců zcela bez potřeby exogenního inzulínu a výbornou kompenzací diabetu potvrzuje nejen téměř normální hodnota glykovaného hemoglobinu (4,2 %), ale také záznam kontinuální

ho senzoru koncentrací krevního cukru v podkoží (obr. 6).

Ve třetí kategorii podstoupili tři pacienti kombinovanou transplantaci jater a ostrůvků od stejného dárce. Ostrůvky byly po ukončení transplantace jater infundovány přímo do portální žíly. Základní indikací k tomuto výkonu u dvou pacientů s diabetem 1. typu bylo jaterní selhání ve stadiu Child Pugh C v důsledku primární sklerozující cholangitidy. U obou pacientů zůstává po 3 letech detekovatelná produkce C-peptidu, nicméně oba potřebují standardní intenzifikovanou inzulínovou léčbu.

Kazuistika 3

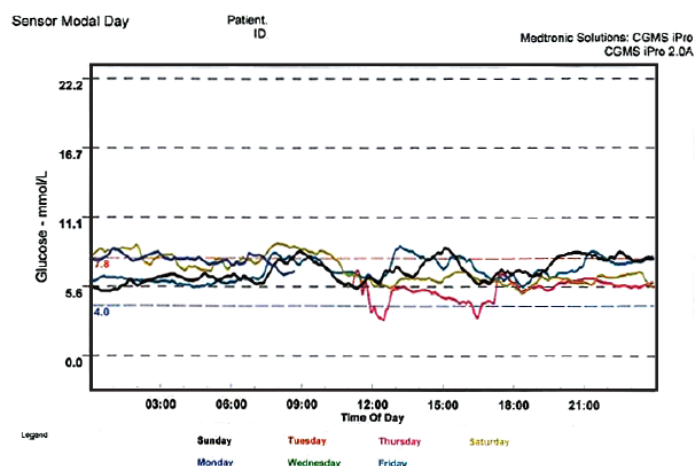
Třetí pacientka je specifická z pohledu diagnózy, operačního postupu i výsledku transplantace. Jde o padesátiletou ženu, u které byl diagnostikován inzulínom pankreatu metastazující do jater. Tato pacientka podstoupila v jedné době odstranění jater, pankreatu (s následnou negativitou C-peptidu), sleziny a duodena a poté byla provedena transplantace jater a ostrůvků. Po 5 měsících je pacientka bez potřeby exogenního inzulínu, bez hypoglykemií a bez příznaku diseminace primárního nádoru. Hodnota glykovaného hemoglobinu činí 4,1 %.

Poslední, čtvrtou kategorii, zastupuje pět pacientů, u kterých vznikl diabetes sekundárně po totální pankreatektomii. V jednom případě se jednalo o bolestivou formu chronické hereditární pankreatitidy, u ostatních byla provedena reziduální pankreatektomie pro pankreatickou píštěl po předchozí resekci hlavy pankreatu a duodena pro expanzivní procesy. Ve všech případech byla k izolaci dodána jen část kaudy pankreatu, která navíc byla postižena chronickým zánětem a fibrózou. Počet izolovaných ostrůvků u tří pacientů proto činil pouze 60 000–170 000 ostrůvkových ekvivalentů a jen v jednom případě byl 310 000. Na rozdíl od všech ostatních kategorií nebyly v těchto případech ostrůvky purifikované a tkáň o objemu 10–25 ml byla pooperačně přímo infundována do vena portae. Implantace ostrůvků proběhla bez komplikací a bez nápadnějšího vzestupu portálního tlaku během implantace. Za 6 měsíců po výkonu byla kompenzace diabetu u všech operovaných sice uspokojivá (glykovaný hemoglobin v průměru $5,2 \pm 0,5$ %), ale všichni potřebovali 18 až 40 j. inzulínu denně.

DISKUZE

První klinické transplantace ostrůvků byly provedeny v sedmdesátých letech 20. století, nicméně až do roku 2000 byla úspěšnost velmi nízká. Zavedení semiautomatické kontrolované digesce po intraduktální injekci kolagenázy do pankreatického vývodu metodou podle Ricordiho (7), zdokonalení purifikace pomocí buněčného separátoru Cobe a konečně vypracování specifické metody implantace a imunosuprese na přelomu století přinesly první technicky úspěšné série pacientů a s nimi také velký optimismus. Transplantace ostrůvků však ještě i dnes zůstává spíše ojedinělou metodou, která může být prováděna pouze na pracovištích s velkou transplantací zkušeností a personálním i přístrojovým vybavením. Podmínkou jsou úzká spolupráce chirurgů provádějících multiorgánový odběr a konzervaci, diabetologů zaměřených na transplantaci péči, vyškoleného týmu lékařů a biologů zvládajících techniku izolace a purifikace ostrůvků a konečně radiologů zvládajících bezpečnou kanylací portální žíly.

Ani samotná izolace stále není standardní metodou a na základě mezinárodní spolupráce se postupně zlepšuje. Pracuje se převážně s místně vyrobenými prototypy přístrojů a pomů-



Obr. 6. Kontinuální záznam koncentrací glukózy v podkoží po dobu 4 dnů u pacienta 10 měsíců po kombinované transplantaci ledviny a Langerhansových ostrůvků (Počítačový záznam hodnot měřených pomocí sensoru Medtronic; pacient je bez terapie inzulínem.)

cek, jako jsou například třepací zařízení, izolační komory a termoregulační aparát. Rovněž složení izolačních roztoků se na různých pracovištích liší. Předvídatelnost výsledku izolace ostrůvků komplikují zatím stále veliké rozdíly v aktivitě různých šarží kolagenázy a nestejná kvalita odebraných orgánů, jež je závislá na věku a tělesném habitu dárce.

Dlouhodobým cílem transplantace ostrůvků je navození stabilní normoglykémie, která povede nejen k bezprostřednímu zlepšení kvality života, ale dokáže navíc předejít vzniku nebo další progresi mikroangiopatických komplikací diabetu. Za podmínku úspěchu se nyní považuje získání dostatečného množství kvalitních ostrůvků v celkovém množství asi 10 000 na 1 kg hmotnosti příjemce. Kromě toho je však nutné bezprostředně zabránit zániku ostrůvků z důvodu místní koagulace a ischemie a z dlouhodobého hlediska předejít jejich poškození nejen rejekčním, ale také autoimunitním procesem, který je charakteristický pro diabetes mellitus 1. typu.

Uvedené podmínky se zatím daří splnit pouze částečně. Odhaduje se, že od roku 2000 bylo ve světě léčeno transplantací ostrůvků asi 1000 pacientů. Alespoň přechodné nezávislosti na exogenním inzulínu se podařilo dosáhnout asi v 15–80 % případů. Například na v současné době nejlépe renomovaném pracovišti v Edmontonu nepotřebovalo téměř 80 % osob léčených jednou až čtyřmi transplantacemi přechodně inzulín. Po 5 letech však toto číslo pokleslo na 15 % (17). V mezinárodní prospektivní studii vyhodnocující tzv. Edmontonský protokol bylo možné přerušit léčbu inzulínem u 52 % případů, ale po 2 letech zůstávalo bez inzulínu pouze 15 % léčených (10). Přitom se jedná o pracoviště, které ostrůvkové transplantace upřednostňuje před orgánovou transplantací, a tudíž kvalita použitých orgánů je evidentně vysoká. Existují však také pracoviště, která u malých sérií osob s dobrými předpoklady úspěchu (nízká potřeba inzulínu, nízká hmotnost) a při použití specifické imunosupresivní a další doprovodné léčby dosahují vysoké úspěšnosti i po provedení jediné implantace (18). To nasvědčuje, že potenciál metody je velký. Kromě toho se ale ukazuje, že byť jen částečné obnovení endogenní sekrece inzulínu znamená pro pacienty přínos. Téměř pravidelně se totiž stabilizují glykemické profily a zejména jsou eliminovány těžké hypoglykemické příhody u osob trpících syndromem porušeného vnímání hypoglykémie. Samotné dosažení nezávislosti na inzulínu není tedy ještě v současné době hlavním cílem léčby a ve většině center se ostrůvkové transplantace indikují právě u pacientů s touto poruchou.

V Institutu klinické a experimentální medicíny nyní existuje komplexní organizace transplantací péče o nemocné s diabetem. Při náhradě chybějící inzulínovotvorné tkáně je dávana

přednost orgánové transplantaci pankreatu a pouze orgány, které nesplňují kritéria pro tento typ transplantace, jsou poskytovány pro izolaci a případnou transplantaci ostrůvků. Racionální výběr pro ostrůvkovou transplantaci by se mohl umožnit pouze tehdy, pokud by se prokázalo, že transplantace ostrůvků poskytne obdobné dlouhodobé výsledky.

Naše zkušenosti prozatím prokázaly, že transplantace ostrůvků může mít pro pacienty s nestabilním diabetem jednoznačný přínos. Riziko závažných komplikací je nesrovnatelně nižší než při transplantaci orgánové. Ve většině případů je obnovena endogenní sekrece inzulínu, zlepšuje se kompenzace diabetu, klesá potřeba inzulínu a především nedochází k závažným hypoglykemickým epizodám u osob, které předtím trpěly syndromem porušeného vnímání hypoglykémie se závažnými projevy. Metoda je kromě toho vhodná také pro diabetické příjemce, kteří současně podstupují transplantaci ledviny nebo jater. Zatím jednotlivé případy ukázaly, že po transplantaci ostrůvků je možné ukončit léčbu inzulínem a zajistit téměř normální hodnoty glykémie.

Zvládnutí techniky izolace ostrůvků je možné využít také v jiné oblasti. Totální pankreatektomie vede nevyhnutelně ke vzniku diabetu. Metabolická kontrola je často špatná, protože zcela chybí sekrece nejen inzulínu, ale také kontraregulačního hormonu glukagonu. Autotransplantací ostrůvků lze předejít vzniku diabetu až u 1/3 případů a u další 1/3 přispěje autotransplantace k lepšímu vyrovnání diabetu. Úspěch izolace ostrůvků ale závisí na stupni poškození pankreatu předchozí chorobou. Nejtypičtější diagnózou je bolestivá forma chronické pankreatitidy nebo chirurgicky již neléčitelná pankreatická píštěl po předchozích resekcích (19). Vzhledem k tomu, že při autotransplantaci není potřebná imunosupresivní léčba a implantace během operačního výkonu je poměrně jednoduchá, odpadá hlavní námitka proti tomuto způsobu léčby. Naše výsledky ukázaly, že i z poměrně malé části odebraného pankreatu, který je zánětlivě postižen, je možné získat významné množství inzulín produkující tkáně, která přispěje k udržování dobrého vyrovnání diabetu. Domníváme se proto, že možnost autotransplantace ostrůvků by neměla být opomenuta v žádném případě elektivní pankreatektomie, u které nepředpokládáme přítomnost maligního nádoru v odebrané tkáni a diabetes není přítomen již před samotnou pankreatektomií.

Transplantace alogenních ostrůvků izolovaných z pankreatu multiorgánových dárců orgánů nemůže ani v budoucnu představovat standardně používaný způsob léčby diabetu 1. typu, protože počet případných příjemců enormně převyšuje orgánovou nabídku. Bezprostřední perspektiva metody spočívá v dalším zdokonalení izolační techniky a vypracova-

ní postupů, které zlepšují přežívání ostrůvků bezprostředně po implantaci. To může spočívat například například v lokální inhibici koagulační kaskády, zlepšení odolnosti ostrůvků proti hypoxii a ve stimulaci revaskularizačních procesů. Naděje se rovněž vkládá ve stimulaci regenerace transplantovaných beta-buněk, např. účinkem inkretinů, které se nyní používají v léčbě diabetu 2. typu. Používat by se mohly také jiné imunosupresivní léky, které by na rozdíl od dosud používaného takrolimu a sirolimu neměly inhibiční efekt na produkci inzulínu a nebránily diferenciaci kmenových buněk. Testována jsou také alternativní místa implantace ostrůvků, jako jsou například kostní dřev a vaskularizované implantovatelné komůrky. Uvedené postupy se mohou uplatnit v nejbližších letech a přispět tak k tomu, aby se efektivita ostrůvkové transplantace vyrovnala orgánové transplantaci pankreatu, oproti níž by ale byla pro pacienta podstatně bezpečnější (20). Zkušenosti získané při léčbě zatím vysoce selektovaných pacientů s nestabilním diabetem 1. typu se v budoucnu nepochybně uplatní také při využití alternativních zdrojů inzulínu produkující tkáně, jako jsou kmenové či indukované pluripotentní prekurzorové buňky, jež by v nepříliš vzdálené budoucnosti mohly být dostupné pro širší okruh příjemců.

Transplantace alogenních ostrůvků zůstává zatím indikovaná zejména pro pacienty se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie a rychlou progresí mikrovaskulárních komplikací. Další indikaci odstavuje kombinovaná transplantace ledviny a ostrůvků, zejména u osob s vyšším rizikem náročného chirurgického zákroku. V Institutu klinické a experimentální medicíny jsou nyní dostupné různé varianty transplantací péče, které dovolují pro pacienty s diabetem volit optimální postup a využít přitom nejvhodnějším způsobem nabídku kadaverózních orgánů. Probíhá rovněž výzkum alternativních zdrojů tkáně, které by mohly být využity v budoucnosti.

Zkratky

CMRL – Connaught Medical Research Laboratories Medium

LITERATURA

1. Kopecký A. Dějiny cukrovky. Praha: Sdružení rodičů a přátel diabetických dětí v ČR 2000.
2. The DCCT Study Group. Adverse events and their association with treatment regimens in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 1995; 18(11): 1415–1427.
3. Kočandrle V, Bartoš V, Vaněk I, Neuwirthová K, Vondra K. Transplantation of the pancreas and kidney in a patient with diabetic microangiopathy. *Čas Lék čes* 1984; 123(5): 118–120.
4. Saudek F, Bouček P, Adamec M. Pancreas transplantation: who and when? *Čas Lék čes* 2001; 140(7): 195–199.
5. Adamec M, Saudek F. Transplantace slivky břišní a diabetes mellitus. Praha: Karolinum, Galén 2005.
6. Troppmann C, Gruessner AC, Dunn DL, Sutherland DE, Gruessner RW. Surgical complications requiring early relaparotomy after pancreas transplantation: a multivariate risk factor and economic impact analysis of the cyclosporine era. *Ann Surg* 1998; 227(2): 255–268.
7. Saudek F. Léčba diabetu transplantací. Praha: Maxdorf 2003.
8. Harlan DM, Kenyon NS, Korsgren O, Roep BO. Current advances and travails in islet transplantation. *Diabetes* 2009; 58(10): 2175–2184.
9. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 230–238.
10. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355(13): 1318–1330.
11. Fiorina P, Shapiro AM, Ricordi C, Secchi A. The clinical impact of islet transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(10): 1990–1997.
12. Girman P, Berkova Z, Dobolilova E, Saudek F. How to use image analysis for islet counting. *Rev Diabet Stud* 2008; 5(1): 38–46.
13. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 2005; 5(8): 2037–2046.
14. Saudek F, Jiráček D, Girman P, Herynek V, Dezortová M, Kříž J, Peregrin J, Berková Z, Zacharovová K, Hájek M. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans. *Transplantation* 2010; 90: 1602–1606.
15. Villiger P, Ryan EA, Owen R, et al. Prevention of bleeding after islet transplantation: lessons learned from a multivariate analysis of 132 cases at a single institution. *Am J Transplant* 2005; 5(12): 2992–2998.
16. Mindlová M, Saudek F. Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykemiemi, jeho klinické hodnocení a terapie. *Prakt Lék* 2007; 87: 52–57.
17. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54(7): 2060–2069.
18. Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV, et al. Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. *Am J Transplant* 2004; 4(3): 390–401.
19. Blondet JJ, Carlson AM, Kobayashi T, et al. The role of total pancreatectomy and islet autotransplantation for chronic pancreatitis. *Surg Clin North Am* 2007; 87(6): 1477–1501.
20. Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes* 2010; 59(6): 1285–1291.

Práce vznikla s podporou grantu „Výzkumný záměr IKEM“ MZO 00023001.

**PREVALENCE AND RISK FACTORS OF POLYOMAVIRUS-BK
REPLICATION IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT
RECIPIENTS FROM A SINGLE TRANSPLANT CENTER**

Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M,
Hirsch HH

Clin Transplant. Přijato k publikaci 5.4.2011

Odesílatel: ctradmin@wiley.com

Komu: martina.mindlova@ikem.cz, martina.mindlova@ikem.cz

Datum: 04/05/2011 09:41 odp.

Předmět: Clinical Transplantation - Decision on Manuscript ID CLTX-10-OA-0156.R2

Dear Dr. Mindlova:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center" in its current form for publication in Clinical Transplantation. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Before your manuscript can be published, a completed copyright transfer agreement must be signed and returned to the editorial office. Please go to <http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>, print the form and fax it back to Hillary Bixby at 781-338-8489.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Clinical Transplantation, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. David Sutherland

Editor-in-Chief, Clinical Transplantation

ctradmin@wiley.com

Associate Editor

Comments to Author:

The modifications to the manuscript are acceptable and raises it to a level sufficient for publication

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

I think that this is good to go.

Reviewer: 2

Comments to the Author

Thanks you for allowing me to re-review the paper by Mindlova and colleagues. This study reports on a point prevalence study - as such, this cannot define risk factors but can only help develop hypotheses. The authors still are relatively concrete; the paper needs to contextualize findings with limitations of study methods further.



Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center

Journal:	<i>Clinical Transplantation</i>
Manuscript ID:	CLTX-10-OA-0156.R2
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Feb-2011
Complete List of Authors:	Mindlova, Martina; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Center Boucek, Petr; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Center Saudek, Frantisek; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Center Skibova, Jelena; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Center; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Transplant Center Jedinakova, Teodora; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Center Lipar, Kvetoslav; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Transplant Center Adamec, Milos; Institute for Clinical and Experimental Medicine, Transplant Center Hirsch, Hans; Institute for Medical Microbiology and Div. Infectious Diseases, Transplantation Virology
Keywords:	BKV, PVAN, SPK, Risk factors, Prevalence
Abstract:	<p>Background. BK virus (BKV) replication is considered as a marker of risk for polyomavirus BK-associated nephropathy (PVAN). We evaluated the occurrence and risk factors for BKV DNA positivity following simultaneous pancreas/kidney transplantation (SPK).</p> <p>Methods. Point prevalence of BK viremia and viremia was assessed in 183 SPK recipients. Real-time PCR was used with a detection threshold of 10^3 copies/mL. High-level BKV positivity was defined as viremia and/or viremia $>10^7$ and $>10^4$ copies/mL, respectively. BKV-positive patients were retested after 4-13 months and underwent an additional 6-month clinical follow-up.</p> <p>Results. Urine and serum BKV positivity was detected in 28 (17.3% of available samples) and 7 (3.8%) patients, with high-level viremia and viremia occurring in 6 (3.7 %) and 3 (1.6%) patients, respectively. PVAN was biopsy-confirmed in 1 and suspected as cause of progressive renal failure in another SPK recipient. Patients with single low-level viremia did not progress to high level positivity or PVAN at follow-up. In multivariate analysis, pre-transplant diabetes duration and delayed graft function were independently associated with BKV positivity.</p>

	<p>Conclusions. Point-prevalence of high-level BKV positivity and PVAN was low in SPK recipients from a single center. Diabetes duration and delayed graft function were independent risk factors for BKV replication.</p>

Clinical Transplantation

Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center

Martina Mindlova¹, Petr Boucek¹, Frantisek Saudek¹, Jelen Skibova^{1,2}, Teodora Jedinakova¹, Kvetoslav Lipar², Milos Adamec², and Hans H.Hirsch³

¹Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology and Div. Infectious Diseases, Universitätsspital Basel, Switzerland

Running head: Polyomavirus-BK in pancreas/kidney transplantation

Corresponding author:

Petr Boucek, MD,

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine,

Videnska 9, 14021 Prague 4, Czech Republic.

Tel.: +420-261363158; fax +420-261362820

E-mail: petr.boucek@ikem.cz

Supported by the grant MZO 00023001 of the Czech Ministry of Health

Clinical Transplantation

Abstract

Background. BK virus (BKV) replication is considered as a marker of risk for polyomavirus BK-associated nephropathy (PVAN). We evaluated the occurrence and risk factors for BKV DNA positivity following simultaneous pancreas/kidney transplantation (SPK) .

Methods. Point prevalence of BK viremia and viremia was assessed in 183 SPK recipients. Real-time PCR was used with a detection threshold of 10^3 copies/mL. High-level BKV positivity was defined as viremia and/or viremia $>10^7$ and $>10^4$ copies/mL, respectively. BKV-positive patients were retested after 4-13 months and underwent an additional 6-month clinical follow-up.

Results. Urine and serum BKV positivity was detected in 28 (17.3% of available samples) and 7 (3.8%) patients, with high-level viremia and viremia occurring in 6 (3.7 %) and 3 (1. 6%) patients, respectively. PVAN was biopsy-confirmed in 1 and suspected as cause of progressive renal failure in another SPK recipient. Patients with single low-level viremia did not progress to high level positivity or PVAN at follow-up. In multivariate analysis, pre-transplant diabetes duration and delayed graft function were independently associated with BKV positivity.

Conclusions. Point-prevalence of high-level BKV positivity and PVAN was low in SPK recipients from a single center. Diabetes duration and delayed graft function were independent risk factors for BKV replication.

Key Words: BKV, PVAN, SPK, Risk factors, Prevalence

Corresponding author:

Petr Boucek, MD,

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine,

Videnska 9, 14021 Prague 4, Czech Republic.

Tel.: +420-261363158; fax +420-261362820

E-mail: petr.boucek@ikem.cz

Introduction.

Polyomavirus BK-associated nephropathy (PVAN) has emerged as an important cause of graft loss in renal transplantation (1, 2). Since effective antiviral treatment of PVAN is still lacking, current management consists mainly in timely reduction of immunosuppression (IS). For this purpose, systematic early screening for BK virus (BKV) replication is recommended in kidney transplant (KT) recipients (3). While optimal screening methods and algorithms remain to be defined, the use of real-time polymerase chain reaction (PCR) with quantification of viral loads in urine and/or plasma is uniformly included in most recommendations (3, 4). In fact, sustained plasma BKV loads of $>10^4$ /mL have been used to define “presumptive PVAN” in KT patients in order to reduce immunosuppression, since histological proof may be missing due to focality of early stages of the disease (3, 5).

Although PVAN has been described in patients after simultaneous pancreas/kidney transplantation (SPK), there is inconsistent data on its incidence and associated risk factors. Moreover, SPK patients may differ from non-diabetic KT recipients in several important aspects (e.g. intensity of maintenance IS or risk of pancreas rejection following reduction of IS). The rates of PVAN have varied substantially among the individual reports which were all single-center retrospective studies (6-9). Moreover, no analysis so far has included systematic information on rates of viruria and viremia and their time course which is prerequisite for the preparation of surveillance screening protocols. Therefore, we performed a cross-sectional study of BKV replication in urine and plasma and conducted an analysis of risk factors of BK replication or PVAN in SPK recipients attending a major transplant center.

Patients and Methods.

Study design: We enrolled all patients with at least one functioning graft following a first SPK performed in the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM) in Prague, Czech Republic, during the period 12/1985-03/2008 (n=205; 179 patients with function of both grafts, 21 and 5 with function of only kidney or pancreas, resp.). SPK patients with kidney (n=19) or pancreas (n=3) graft retransplants were excluded from the study. Urine and blood samples were obtained from the remaining 183 patients at a routine follow-up visit during the two-year time period between May 1, 2006 and March 31, 2008. Patients who underwent a first SPK during this period (n=25) were also enrolled into the study. Signed informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the local Ethics committee.

Viral DNA loads in urine and plasma were quantified by real-time PCR as described previously (10) with a detection threshold of BKV positivity (replication) 10^3 copies/mL. Urine BKV loads $>10^7$ copies/mL and/or plasma BKV loads of $>10^4$ copies/mL were considered as high level BKV positivity.

(3). Lower BKV loads above 10^3 copies/mL were defined as low-level positivity. Patients with any level of urine and/or plasma positivity were retested after 4-13 months and their clinical course and creatinine level were reviewed after an additional 6-month period. (Tables 3 and 4). In cases of repeated high level plasma positivity a graft biopsy with SV40 T antigen staining was performed (SV40 T antigen staining of all renal graft biopsies was not done routinely at our centre until February 2009). Patients who were initially both urine and plasma negative were retested after approximately one year.

Immunosuppressive therapy. At transplantation, patients received short-term high-dose methylprednisolone. Induction therapy was used in 173 recipients (rabbit polyclonal anti-T cell antibody in 156, OKT3 in 4 and daclizumab in 13 patients). The following maintenance immunosuppression (IS) protocols were used consecutively in three periods: Period I (1987-1998) IS consisted of cyclosporin A (CyA) with both azathioprine or mycophenolate mophetil (MMF) and steroids. In period II (1998-2002) either CyA/MMF or tacrolimus (Tac)/MMF were administered with steroid withdrawal at 6 months post transplant according to the EURO SPK 001 trial protocol (11). In period III (2002-2007), IS included tacrolimus with either MMF or sirolimus with steroids withdrawal at 6 weeks according to the EURO SPK 002 trial protocol (12). Cyclosporin A initial dose was 7 mg/kg/day, blood levels were maintained at 150-250 ng/mL for the first 6 months, then at 100-200 ng/mL. Tacrolimus was initially dosed as 0.2 mg/kg/day and trough levels were maintained at 8-15 ng/mL for 6 months and at 5-10 ng/mL afterwards. Initial daily azathioprine and MMF dosage was 1-2 mg/kg and 2g, respectively. Sirolimus initial dose was 2mg with target levels of 5-10 ng/mL throughout the follow-up period.

Statistical analysis. We identified patients with urine and/or plasma BKV positivity and assessed its cross-sectional point-prevalence. Risk factors for BKV replication were analyzed in a subgroup of subjects transplanted after November 23, 1998 thereby covering a 10-year period during which tacrolimus was available in our center. Univariate analysis was carried out using the Mann-Whitney test for continuous variables and the chi-square test or the Fischer's exact test for categorical variables. Variables associated with PVAN in other studies or with $p < 0.10$ in univariate analysis were entered into a multivariate logistic regression model. The dependent variable was presence of BKV viruria and/or viremia. BMDP statistical software package (BMDP Statistical Software, Inc., UCLA, Los Angeles, CA, USA) was used for all statistical calculations.

Results

The point prevalence of BKV replication was assessed in 183 patients at 49 (median, range 1-250) months after SPK (Table 1). A urine sample was not obtained from 21 patients. Viruria was detected

in 28 (17.3%; median urine BKV load 1.16×10^4 copies/mL; range (1.42×10^3 - 5.0×10^8)) and viremia in 7 (3.8%; plasma BKV load 1.46×10^3 copies/mL; range (1.1×10^3 - 6.0×10^6)) patients. All 7 viremic patients had also detectable viruria. High-level viruria with $>10^7$ copies/mL was present in 6 patients (3.7%; urine BKV load 7.81×10^7 copies/mL; range (1.04×10^7 - 5.17×10^8)). High-level viremia was found in 3 (1.6%; 1.6×10^4 , 5.76×10^5 and 5.6×10^6 copies/mL) patients, with simultaneous high-level viruria (5.6×10^7 , $>1.0 \times 10^8$ and 5.2×10^8 copies/mL).

Initially negative patients (n=129) for both urine and plasma were retested after 15 (median; range 8-20) months. A change to BKV positivity was seen in 12 patients (0.074 rate per patient-year; all except 1 patient were low-level positive for urine and 1 was low-level positive for plasma; 1 patient was high level positive for urine and negative for plasma). PVAN did not develop in any patient.

The relative distribution of BK-positive and -negative patients in relation to time from transplantation is shown in Figure 1. The highest proportion of BK-positive patients is present in the first four two-year periods following SPK.

Risk factors for BKV replication were assessed in 135 SPK recipients. The following variables were included initially into the univariate analysis (Table 2): gender, age, duration of diabetes and dialysis before transplantation, cold ischemia time, total HLA mismatch, delayed (more than 3 days) vs. immediate graft function, time from SPK, initial IS (Tac vs. CyA), any rejection treatment, IS at the time of study (Tac vs. CyA) and creatinine level at the time of study. Of the three variables with a significant difference between the two groups in univariate analysis (duration of diabetes and dialysis before transplantation, delayed graft function) (Tab. 2) only duration of diabetes before transplantation (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p=0.028$) and delayed graft function (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p=0.0085$) were independently associated with BKV replication in multivariate analysis. Interestingly, the type of IS was not found to be a risk factor and there were also no significant differences in the proportion of BKV positive patients between the individual IS periods (data not shown).

Laboratory and clinical course in patients with BKV replication

Laboratory and clinical data of 22 patients with low-level urine BKV positivity - median (range) 6.77×10^3 (1.08×10^3 - 1.57×10^6) copies/mL - in the point-prevalence study are summarized in Table 3. Except for patient No. 21 all patients were plasma negative. No changes in immunosuppressive treatment were initiated on the basis of the PCR results. When retested after median (range) 11.5 (8-13) months no patient progressed to high-level viruria, viruria was negative in 11 (50%) patients and all patients were plasma negative. A clinically significant ($\geq 20\%$) increase in plasma creatinine at the end of the study period (at six months after retesting) occurred in only two patients (No. 10 and 18). However, both were PCR negative at retesting and kidney graft function worsening was attributed to

other causes (chronic rejection in one and chronic rejection plus recurrence of diabetic nephropathy in the other).

Laboratory and clinical data of patients with high-level BKV loads are shown in Table 4. Both high-level viruria and viremia confirmed by repeated testing was seen in two patients (No. 5 and 6). Despite changes in IS (reduction of the tacrolimus and MMF dose) and cidofovir administration high-level viremia and viruria persisted in patient No. 5 and PVAN pattern B was confirmed by renal biopsy. Nonetheless, at 6 months after last BKV testing renal graft function remained stable with only slightly elevated plasma creatinine levels.

Patient No. 6 had sustained high-level viremia and viruria with decreasing renal function in spite of a reduction of the dose of tacrolimus and administration of cidofovir. Graft failure occurred 19 months after the initial finding of high level-viremia. It was attributed to PVAN although repeated renal biopsies were BKV (SV40T) negative and only chronic, T-cell mediated rejection with severe interstitial fibrosis and no signs of BKV replication were found in the kidney graft which was explanted 8 months after the initiation of dialysis treatment.

No deterioration of renal graft function was seen in any other patient. High-level viruria and viremia in patient No. 3 and high-level viruria in patient No. 1 were only transient. Pancreatic graft function was excellent with insulin-independence in all patients.

Discussion.

The main purpose of this prospective study was an analysis of the occurrence and risk factors for BKV replication in an SPK population from a major transplant center. In contrast to available data on kidney transplants in non-diabetic recipients, to the best of our knowledge, none of the previous reports on active BKV infection following SPK included similar systematic information on BK virus positivity. We found comparable rates of any level of BK viruria, but slightly lower rates of viremia than those reported in cross-sectional studies of kidney transplant recipients from other centers (5, 13, 14). Occurrence of new BKV positivity in a repeat examination of initially BKV negative patients was low.

The incidence of biopsy-proven PVAN (number of cases of PVAN/number of SPKs) in studies of SPK recipients from other centers ranges from 2.9 (8) to 7.5% (6). A similar retrospective study of PVAN incidence in SPK has not been performed in our center. Since very advanced stages of PVAN may be undistinguishable morphologically from other causes of graft failure and systematic SV40 T antigen staining of all biopsies was introduced only in February 2009 such a study would probably provide a serious underestimate of the true PVAN occurrence in our SPK population in the past.

However, the number of biopsy-proven cases of PVAN identified as the cause of primary graft failure in patients with a subsequent kidney retransplant (5 cases of PVAN in 14 patients with 16 kidney retransplants) confirms that PVAN had been a significant cause of kidney graft failure in SPK recipients in our center as well.

On the other hand, the low point-prevalence of high-level BKV replication and PVAN in our current study may suggest that the occurrence of significant BKV infection in SPK populations could be decreasing in the recent period. We believe that such a trend is also recognizable from a comparison of studies of PVAN in SPK recipients which have originated from slightly different time periods. The reports from the University of Tennessee, Memphis and University of California, San Francisco, both with a higher PVAN incidence (7.5 and 6.2%), covered the more distant time periods of 1994-1998(6) and 1996-2002(7), respectively. Increasing awareness of the problem and accumulating experience with preventive and therapeutic measures in the field may have already played a role in the somewhat lower PVAN incidence seen in more recent studies. Thus, a PVAN incidence of 1.4% and 4.4% was reported from the last period (2001-2004) of the study of Gupta et al.(8) from the University of Pittsburgh Medical Center and in a very recent study covering the period 2000-2006 by Ison et al.(9) from the Northwestern University Chicago, respectively. .

If confirmed as true by future studies, some contributing factors for such a trend could possibly be suggested, e.g., time differences in the overall degree of immunosuppressive therapy or a change in the use of steroids. In the University of Tennessee transplant center target immunosuppressive blood levels and occurrence of PVAN were significantly higher in SPK than in kidney transplant patients (7.5 vs. 1%)(6). Both SPK centers with a high PVAN occurrence used triple-drug maintenance immunosuppression including steroids (6, 7) or sirolimus(7). Dadhania et al. have shown that induction with ATG and steroid maintenance therapy were independent risk factors for BKV replication in a study of kidney transplant recipients(15). Interestingly, even in patients treated with full dose ATG therapy a beneficial effect of early steroid withdrawal was evident. Prednisone dose was also found to be a significant risk factor for PVAN in a retrospective study in renal allograft recipients (16). by Manitpisitkul et al. Steroids were avoided in the second, low-incidence period of the University of Pittsburgh Medical Center study (8) and oral prednisone was not used at all as part of maintenance IS in the study by Ison et al.(9). Similarly, the role of steroids as a risk factor of PVAN seems to be supported by the low prevalence of high-level BKV positivity in our center since we have been consistently using immunosuppressive regimens with early steroid withdrawal (currently at 6 weeks post-transplant) throughout the last decade.

No head to head comparisons of individual immunosuppressive agents with regard to PVAN risk are available in SPK populations. In KT patients, however, a direct comparison and recent registry data suggest that, while no single agent may be associated with an increased risk of BKV replication or

PVAN, the combination of tacrolimus and MMF poses an increased risk over cyclosporine and MMF.(17-19) Similarly, viruria was highest with the Tac/MMF and lowest with CyA-MMF combination in the randomized study by Brennan et al.(20). Treatment with Tac was a significant risk factor for both BK viruria and viremia in a prospective longitudinal study by Bressollette-Bodin et al.(21) and risk of biopsy-proven PVAN was associated with tacrolimus blood levels in the study by Manitpisitkul et al.(16) and Mengel et al. (22). However, Dadhania et al. did not find any difference in the tacrolimus dose or trough level between those with or without BKV replication (15). In our study, the use of Tac as opposed to CyA in the initial and maintenance IS did not constitute a significant risk factor for BKV replication. This finding suggests that the overall level of immunosuppression rather than the use of any specific agent besides steroids determines the risk of BKV replication or PVAN in kidney and pancreas transplantation.

While differences in the use of immunosuppressive therapy could represent the reason of lower point-prevalence of high-level BKV positivity and PVAN in comparison with available data from kidney transplant centers (5, 13, 14), alternative explanations should be considered as well. A shortcoming of our study is its essentially cross-sectional design, which precludes definitive conclusions on the incidence of serious BKV infection. Thus, as shown in Figure 1, examinations in a significant proportion of our patients were performed already beyond the time period of highest risk (0-2 years following SPK (3)). On the other hand, low donor age (23) and very short ischemia times (21) in most of our SPKs may have also played a role. Almost 80 % of the donors were from the 12-17 and 18-35 age categories with the lowest odds ratio of risk of treatment for BKV in the study by Schold et al (23) based on data from the US Scientific Registry of Transplant Recipients.

Of the two clinical recipient characteristics (duration of diabetes and of dialysis treatment) associated with increased risk of BKV replication in univariate analysis only pre-transplant duration of diabetes mellitus was confirmed as an independent risk factor in multivariate analysis. One may speculatively interpret this finding as some kind of cumulative negative effect of the presence of the diabetic metabolic milieu. Diabetic renal transplant recipients were at increased risk of PVAN in some(6), but not all(13), past studies which did include risk factor analyses. Among transplant-related variables, delay in initial kidney graft function of more than 3 days was identified as an independent risk factor in multivariate analysis. This may reflect a potential permissive effect of initial ischemic graft injury for BKV replication. A similar explanation was offered in the past for associations of PVAN with the number of HLA mismatches or prior acute rejection episodes (3). However, we have not found any effect of duration of cold ischemia although this undoubtedly also relates to the short cold ischemia times seen in most of our SPK patients.

Early identification of BKV infection is a prerequisite for successful treatment which so far consists mainly in reducing the intensity of maintenance immunosuppression. Consequently, regular use of

screening methods such as urine cytology (presence of decoy cells), urine VP-1 mRNA and urine or plasma DNA loads with adjunctive quantitative testing in cases of positivity has been advocated by the interdisciplinary consensus in all kidney transplant recipients (3). The optimal screening procedures, intervals, and positivity cut-off values for a timely and cost-effective detection of PVAN risk remain to be established definitely. Nevertheless, in this regard past studies have clearly demonstrated the superiority of urine and/or plasma BKV PCR compared to urine cytology (5). Ideally, screening should be probably started immediately after transplantation (active BKV infection appeared within the first three months post-transplant in 80% of the BKV positive patients in the study by Bressollette-Bodin (21)) and performed monthly during the first 6 months since some cases of PVAN may be missed by screening at 3-month intervals (24). Since viruria precedes both viremia and histologically demonstrable PVAN by several weeks (3, 25) it may possibly represent the optimal initial screening procedure.

However, in a recent prospective study of KT recipients by Babel et al.(14) persistent BKV detection in two or more consecutive urine samples was associated with significantly higher BKV urine loads and had a much higher specificity and positive predictive value for BK viremia and PVAN than single sample positivity. Only sustained BK viruria would thus represent a reliable marker allowing an early identification of patients at high risk of PVAN. Although we have not performed a systematic analysis of screening for BKV replication or PVAN in our SPK population, nonetheless some of our data seem to be consistent with such a conclusion. None of our 22 patients with single low-level urine BKV positivity in the initial study progressed to high-level viruria or viremia at follow-up. Thus an isolated finding of urine low-level BKV replication probably per se does not mandate further invasive testing or initiation of therapeutic measures in SPK recipients. Alternatively, our results may suggest, that testing of the efficacy and cost-effectiveness of direct measurements of plasma viral loads for the prevention of PVAN without the prior use of urine samples should be still considered for future studies.

In conclusion, this is the first study assessing in a prospective manner the rate of BK viruria and viremia in patients after SPK in a single transplant center. The point - prevalence of high-level viruria and viremia, as well as occurrence of biopsy-proven PVAN were low. Pre-transplant duration of type 1 diabetes mellitus and delayed recovery of kidney graft function following transplantation were identified as the only significant risk factors for BK virus replication in multivariate analysis.

References

1. Bonvoisin C, Weekers L, Xhignesse P, et al. Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation* 2008; 85 (Suppl 7): S42.
2. Wiseman AC. Polyomavirus nephropathy: a current perspective and clinical considerations. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 131.
3. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277.
4. Nicleleit V, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transplant Int* 2006; 19: 960.
5. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation* 2007; 84: 340.
6. Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, et al. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 21.
7. Lipschutz GS, Mahanty H, Feng S, et al. BKV in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients: a leading cause of renal graft loss in first 2 years post-transplant. *Am J Transplant* 2005; 5: 366.
8. Gupta G, Shapiro R, Thai N, Randhawa PS, Vats A. Low incidence of BK virus nephropathy after simultaneous kidney pancreas transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 382.
9. Ison MG, Parker M, Stosor V, Kaufmann DB. Development of BK nephropathy in recipients of simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 525.
10. Hirsch HH, Mohaupt M, Klimkait T. Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *J Infect Dis* 2001; 184: 1494.
11. Saudek F, Malaise J, Boucek P, Adamec M, EUROSPK Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in primary SPK transplantation: 3-year results of the Euro-SPK 001 trial. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (Suppl 2): 3.
12. Margreiter R, Malaise J, Pratschke J, et al. Sirolimus versus mycophenolate mofetil in tacrolimus based primary simultaneous pancreas-kidney (SPK) transplantation: 6-months results of a multicenter trial. *Am J Transplant* 2006; 6 (Suppl 2): 105.
13. Yeo FE, Yuan CM, Swanson SJ, et al. The prevalence of BK polyomavirus infection in outpatient kidney transplant recipients followed in a single center. *Clin Transplant* 2008; 22: 532.
14. Babel N, Fendt J, Karaivanov S, et al. Sustained BK viremia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation* 2009; 88: 89.
15. Dadhania D, Snopkowski C, Ding R, et al. Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation* 2008; 86: 521.
16. Manitpisitkul W, Drachenberg C, Ramos E, et al. Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. *Transplantation* 2009; 88: 83.
17. Hirsch HH, Friman S, Wiecek A, Rostaing L, Pescovitz M. Prospective study of polyomavirus BK viremia and viremia in de novo renal transplantation (Abstract #77). *Am J Transplant* 2007; 7 (Suppl.5): 150.
18. Dharnidharka VR, Cheriak WS, Abbott KC. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* 2009; 87 (7): 1019.
19. White LH, Casian A, Hilton R, et al. BK virus nephropathy in renal transplant patients in London. *Transplantation* 2008; 85 (7): 1008.
20. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582.

21. Bressolette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1926.
22. Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (6): 1190.
23. Schold JD, Rehman S, Kayle LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transpl Int* 2009; 22: 626.
24. Almeras C, Foulongne V, Guarrigue V, et al. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation* 2008; 85: 1099.
25. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488.

Clinical Transplantation

Table 1. Patient demographics and results of point-prevalence study

No. of patients	183
Male/ female	101/82
Age (years)	43±8.6
Diabetes duration (years)	27±7.9
Time from SPK (months)	49 (1 - 250)*
Insulin independence	159 (87%)
Creatinine (μmol/L)	129 (66-500#)*
Plasma	
Positive BKV replication (n)	7 (3.8%)
Copies/mL	1.46E+03 (1.1E+03 - 6.0E+06)*
High-level replication (n)	3 (1.6%)
Low-level replication (n)	4 (2.2%)
Urine	
Positive BKV replication (n)	28 (17.3%)^
Copies/mL	1.16E+04 (1.42E+03 - 5.0E+08)*
High-level replication (n)	6 (3.7%)^
Low-level replication (n)	22 (13.6%)^
PVAN (n) (biopsy confirmed)	1 (0.5%)

Values are means ± SD

* median (range)

for 5 patients on dialysis creatinine value 500 μmol/L was used

^ Urine sample not available from 21 patients

SPK - simultaneous pancreas/kidney transplant, BKV - polyomavirus BK

PVAN - polyomavirus BK-associated nephropathy

Clinical Transplantation

Table 2. Characteristics of BKV-positive and BKV-negative patients

n=135	BKV positive (n=36)	BKV negative (n=99)	P-value
Male/female	19/17	59/40	0.478
Age (yrs)	44±8.5	42±8.4	0.186
Diabetes duration (yrs)	28.8±8.2	25.8±7.5	0.044
Dialysis duration (mths)	13.8±15	8.1±10.7	0.026
Cold ischemia (hrs)	11.3±4.1	10.5±3.5	0.399
No. of HLA mismatches	5±1	4.7±1	0.128
Delayed*/immediate graft function (n)	14/22	18/81	0.012
Time from SPK (mths)	47(2-96)**	43(0.6-106)**	0.516
Initial immunosuppression (n)			
Tac/CyA	26/10	55/44	0.081
Rejection treatment (n)	2/34	15/84	0.233
Immunosuppression at time of study (n)			
Tac/CyA	27/9	62/37	0.18
	118 (60 – 500)**	126 (69 – 500) **	
Creatinine (μmol/l)	1 patient on dialysis	2 patients on dialysis	0.913

Data are means ± SD

* more than 3 days

**median (range)

Tac = tacrolimus; CyA = cyclosporin A

Clinical Transplantation

Table 3. Demographics and results of follow-up of patients with initial urine low-level BK virus replication

Patient No.	Gender	Age at the time of SPK (years)	Duration of diabetes (years)	Time from SPK to 1st testing (months)	Plasma (copies/mL)	Urine (copies/mL)	Creatinine (μmol/L)	Time from 1st to repeat testing (months)	Plasma (copies/mL)	Urine (copies/mL)	Creatinine (μmol/L)	Creatinine 6 mths after retesting (μmol/L)	IS
1	M	61	39	19	<1.0E+03	1.08E+03	140	11	<1.0E+03	<1.0E+03	115	122	CyA, MMF
2	M	41	26	126	<1.0E+03	1.24E+03	114	10	<1.0E+03	<1.0E+03	120	130	CyA, Aza
3	F	40	25	64	<1.0E+03	1.27E+03	160	12	<1.0E+03	<1.0E+03	152	140	Siro, MMF
4	M	35	21	112	<1.0E+03	1.3E+03	191	12	<1.0E+03	<1.0E+03	105	150	CyA, MMF
5	M	45	27	76	<1.0E+03	1.37E+03	150	8	<1.0E+03	<1.0E+03	147	138	CyA, MMF
6	M	46	24	49	<1.0E+03	1.68E+03	129	10	<1.0E+03	7.7E+03	96	104	Tac, MMF
7	M	38	23	84	<1.0E+03	1.77E+03	104	11	<1.0E+03	<1.0E+03	88	88	CyA, MMF
8	M	48	46	53	<1.0E+03	4.1E+03	122	9	<1.0E+03	6.04E+03	117	109	CyA, MMF
9	F	45	30	89	<1.0E+03	4.34E+03	121	12	<1.0E+03	3.1E+03	111	129	Tac, MMF
10	F	36	21	250	<1.0E+03	5.07E+03	220	11	<1.0E+03	<1.0E+03	230	310	CyA, Aza
11	M	54	22	86	<1.0E+03	6.15E+03	105	10	<1.0E+03	3.91E+03	92	95	CyA, MMF
12	F	33	15	87	<1.0E+03	7.38E+03	164	12	<1.0E+03	2.43E+04	148	170	CyA, MMF
13	M	54	25	83	<1.0E+03	9.34E+03	105	12	<1.0E+03	<1.0E+03	110	103	Tac, MMF
14	F	64	38	62	<1.0E+03	1.16E+04	148	13	<1.0E+03	<1.0E+03	150	160	CyA, MMF
15	F	40	22	4	<1.0E+03	1.59E+04	95	12	<1.0E+03	1.2E+05	100	89	Tac, MMF
16	M	48	43	82	<1.0E+03	1.63E+04	139	12	<1.0E+03	1.57E+03	128	132	Tac, MMF
17	M	33	22	56	<1.0E+03	8.11E+04	136	13	<1.0E+03	5.00E+04	153	160	CyA, MMF
18	F	52	44	10	<1.0E+03	1.13E+05	120	12	<1.0E+03	<1.0E+03	193	230	Siro, MMF
19	F	39	25	30	<1.0E+03	1.79E+05	105	11	<1.0E+03	2.21E+04	93	90	Tac, MMF
20	M	45	30	33	<1.0E+03	2.12E+05	147	13	<1.0E+03	<1.0E+03	143	143	Tac, MMF
21	F	53	41	3	1.16E+03	7.84E+05	100	11	<1.0E+03	2.9E+04	84	92	Tac, MMF
22	F	31	15	43	<1.0E+03	1.57E+06	132	11	<1.0E+03	1.1E+05	160	130	Tac, MMF

Tac - tacrolimus, CyA - cyclosporin A, Aza - azathioprine, MMF - mycophenolate mophetil, Siro - sirolimus
IS - immunosuppression

Table 4. Demographics and results of follow-up of patients with BK virus high-level replication

Patient No.	Gender	Age at time of SPK (years)	Duration of diabetes (years)	Time from SPK to 1st testing (months)	Plasma (copies/mL)	Urine (copies/mL)	Creatinine (μmol/L)	Time from 1st to repeat testing (months)	Plasma (copies/mL)	Urine (copies/mL)	Creatinine (μmol/L)	Creatinine 6 mths after retesting (μmol/L)	IS	Stage of PVAN (biopsy)
1	M	32	24	14	1.1E+03	1.04E+07	97	6	<1.0E+03	8.56E+05	117	122	Tac, MMF	not done
2	F	35	23	5	1.62E+03	2.33E+07	123	6	2.56E+03	3.47E+07	120	115	Tac, Siro	not done
3	M	49	29	87	1.56E+04	5.61E+07	110	6	5.28E+03	1.52E+05	124	130	Tac, Aza	not done
4	M	51	33	17	1.29E+03	>1.0E+08	165	6	1.25E+03	1.02E+08	172	165	Tac, Siro	not done
5	F	42	36	4	5.76E+05	>1.0E+08	118	4	2.11E+06	4.1E+10	124	138	Tac, MMF	B**
6	M	37	29	35	5.6E+06	5.17E+08	133	4	1.37E+05	1.16E+07	180	290*	Tac, MMF	negative

* Graft failure occurred 19 months after first sampling, graftectomy was performed 8 months after starting dialysis

Tac - tacrolimus, Aza - azathioprine, MMF - mycophenolate mophetil, Siro - sirolimus

** Staging PVAN according to (Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Polyomavirus-associated nephropathy: update in diagnosis. Transpl Infect Dis. 2006;8(2):68-75)

Clinical Transplantation

Figure 1. Relative distribution of BK positive and BK negative patients according to the time from SPK

